

UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR

VON PROTEINEN:

FETALES FIBRINOGEN

UND

PROTEINASE-B-INHIBITOREN

AUS HEFE

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Rudolf Tesch



Leiter der Arbeit:

Prof. Dr. H. Holzer

Prof. Dr. I. Witt

Referent:

Prof. Dr. H. Holzer

Korreferent:

Doz. Dr. K. Hilse

Dekan:

Prof. Dr. K. Hahlbrock

1.	<u>Einleitung</u>	6
2.	<u>Elektronenmikroskopische Untersuchungen</u> <u>an Fibrin</u>	8
2.1.	Grundlagen	8
2.2.	Aufgabenstellung	10
2.3.	Methoden	10
2.3.1.	Präparation von fetalem Fibrinogen	10
2.3.1.1.	Materialien	10
2.3.1.2.	Arbeitsvorschrift	11
2.3.2.	Präparation von adultem Fibrinogen	12
2.3.3.	Bestimmung der Reinheit der Fibrinogen- präparationen	12
2.3.4.	Elektronenmikroskopische Untersuchung von Fibringerinnse	12
2.3.4.1.	Materialien	12
2.3.4.2.	Präparation der Fibringerinnse	13
2.3.4.3.	Elektronenmikroskopie	13
2.3.5.	Morphometrische Auswertung	14
2.3.6.	Signifikanztest	19
2.4.	Ergebnisse und Diskussion	23
3.	<u>Automatischer Edman-Abbau</u>	29
3.1.	Grundlagen	29
3.2.	Aufgabenstellung	34
3.3.	Sequenator	34
3.4.	Methoden	35
3.4.1.	Chemikalien	35
3.4.2.	Durchführung eines Sequenzerlaufes	36
3.4.3.	Konvertierung der Thiazolinon-Derivate	38
3.4.3.1.	Hydrolytische Umlagerung	38
3.4.3.2.	Thermische Umlagerung	39
3.4.4.	Derivatisierung von Peptiden	39
3.5.	Programmierung des Sequenators	39
3.6.	Ergebnisse und Diskussion	51
4.	<u>Identifizierung von PTH-Aminosäuren</u>	54
4.1.	Nachweismöglichkeiten	54

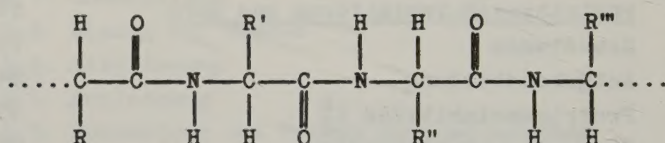
4.2.	Aufgabenstellung	57
4.3.	Gaschromatographie	57
4.3.1.	Gaschromatograph	58
4.3.2.	Trennsäulen	58
4.3.2.1.	Materialien	59
4.3.2.2	Abmessungen und Zusammensetzung der Trennsäulen	59
4.3.2.3.	Belegung der stationären Phase	60
4.3.2.4.	Füllung und Konditionierung der Säulen	60
4.3.3.	Analysenprogramme	61
4.3.4.	Probenaufbereitung	67
4.3.4.1.	Chemikalien	67
4.3.4.2.	Lösung der Proben	67
4.3.4.3.	Silylierung	67
4.3.4.4.	Acylierung	67
4.3.4.5.	Behandlung von Proben derivatisierter Peptide	67
4.3.5.	Auswertung der Chromatogramme	68
4.4.	Dünnschichtchromatographie	69
4.4.1.	Trennung von PTH-Valin und PTH-Glycin	69
4.4.1.1.	Materialien	69
4.4.1.2.	Arbeitsbedingungen	69
4.4.2.	Trennung von PTH-Arginin, PTH-Cystein- säure und PTH-Histidin	70
4.4.2.1.	Materialien	71
4.4.2.2.	Arbeitsbedingungen	71
4.5.	Diskussion	72
5.	<u>Untersuchungen zur Primärstruktur von fetalem Fibrinogen</u>	75
5.1.	Grundlagen	75
5.2.	Aufgabenstellung	79
5.3.	Methoden	79
5.3.1.	Präparation von fetalem Fibrinogen und Fibrin	80
5.3.1.1.	Materialien	80
5.3.1.2.	Arbeitsvorschrift	80
5.3.2.	Reduktion, S-Carboxymethylierung und Kettenisolierung von fetalem Fibrinogen	80

und Fibrin

5.3.2.1. Materialien	81
5.3.2.2. Reduktion und S-Carboxymethylierung	81
5.3.2.3. Reinigung und Isolierung der Peptidketten	82
5.3.3. Spaltung der γ -Kette an den Methionyl- bindungen durch Bromcyan und Trennung der Peptide	84
5.3.3.1. Materialien	84
5.3.3.2. Bromcyanspaltung	84
5.3.3.3. Trennung des Peptidgemisches	85
5.3.4. Sequenzanalysen	87
5.4. Ergebnisse und Diskussion	88
6. <u>Proteinase-B-Inhibitoren aus Hefe</u>	93
6.1. Grundlagen	93
6.2. Aufgabenstellung	94
6.3. Proteinaseinhibitor I ₂ ^B	95
6.4. Ergebnis und Diskussion	96
7. <u>Zusammenfassung</u>	99
8. <u>Anhang</u>	101
8.1. Abkürzungen	101
8.2. Chemikalien	102
9. <u>Literaturverzeichnis</u>	105

1. Einleitung

Nach der klassischen Strukturtheorie von A. Kekulé, A. M. Butlerow und J. H. Van't Hoff besitzt jede Verbindung eine bestimmte Atomstruktur. Diese räumliche Anordnung ist umso komplizierter, je mehr Atome am Aufbau der Verbindung beteiligt sind. Zu den kompliziertesten Verbindungen zählen die Proteine. Das aus Aminosäuren über Säureamidbindungen aufgebaute Grundgerüst, die Primärstruktur



erlaubt bereits eine praktisch unbegrenzte Variationsmöglichkeit in der Anordnung der Aminosäuren. Durch die Valenzwinkel und die energetisch begünstigte Stabilisierung der Peptidketten durch Wasserstoffbrücken von den NH-Gruppen zu den Carbonylsauerstoff-Atomen kommt es zu einer räumlichen Anordnung des Moleküls, der Sekundärstruktur. Die dehydrierende Verknüpfung der SH-Gruppen zweier Cysteine zu Disulfidbrücken ermöglicht die Verknüpfung von Polypeptidketten zu einer Tertiärstruktur. In sich beständige Proteine können schließlich noch ohne kovalente Bindungen zu einer Quartärstruktur zusammengelagert werden.

Die vollständige Aufklärung derartig komplexer Strukturen ist nur unter Inanspruchnahme der unterschiedlichsten Techniken möglich: Das Spektrum reicht von der Röntgenstrukturanalyse zur Bestimmung der Atomabstände und Valenzwinkel über chemische Methoden mit spezifischen Um- und Abbaureaktionen und Analysen zum Auffinden bestimmter Strukturelemente bis hin zur Aufklärung von Größe und Gestalt großer Molekeln mit Hilfe der Feldionen- oder der Elektronenmikroskopie. Ergänzend

kommen dazu noch die Ergebnisse aus Licht- und Röntgenkleinwinkelstreuung, Elektronenbeugung, IR- und Raman-spektroskopie, Dipolmessungen und vieler anderer Methoden. aus dieser Vielzahl von Möglichkeiten werden im Folgenden einige Methoden zur Charakterisierung von Proteinen herangezogen.

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wird die Aggregation von fetalem und adultem Fibrinogen zu Fibrinpolymeren untersucht.

Chemische Methoden kommen bei der Verbesserung des automatischen Edman-Abbaus und der Identifizierung der dabei gebildeten Phenylthiohydantoin-Aminosäuren sowie bei der Spaltung von Polypeptidketten in kleinere Untereinheiten zur Anwendung. Die daraus gewonnenen Ergebnisse ermöglichen die Rekonstruktion der Primärstruktur. Für die Untersuchungen an einigen Peptiden des fetalen Fibrinogens sowie den Proteinase-B-Inhibitoren aus Hefe werden diese Methoden verwendet.

2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Fibrin

2.1. Grundlagen

Die Gerinnung des Blutes erfolgt durch eine Vernetzung des Fibrins, welches durch Einwirkung von Thrombin auf Fibrinogen aus diesem gebildet wird. Fibrinogen ist ein dimeres Molekül und besteht aus drei Paaren von Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Es läßt sich durch die Summenformel



beschreiben. Eine schematische Darstellung der Struktur ist in Abbildung 1 gezeigt (1). Zur Gestalt des Mole-

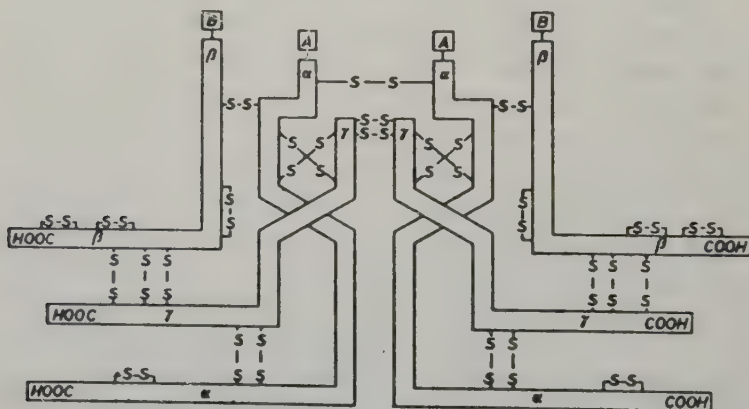
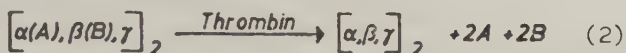


Abb. 1: Schematische Darstellung des Fibrinogen-Moleküls

küls werden in der Literatur zur Zeit noch verschiedene Modelle diskutiert (2 - 5).

Bei der Gerinnung werden die Peptide A und B durch Thrombin vom Fibrinogen-Molekül durch Spaltung der Arginyl-

Glycyl-Bindungen in der $\alpha(A)$ -Kette zwischen den Aminosäuren 16 und 17, beziehungsweise 14 und 15 in der $\beta(B)$ -Kette, abgespalten:



Die so entstehenden Fibrin-Monomere aggregieren über Wasserstoffbrücken und heteropolare Bindungen zum polymeren Fibrin (Abb. 2), das ein räumliches Netzwerk bil-

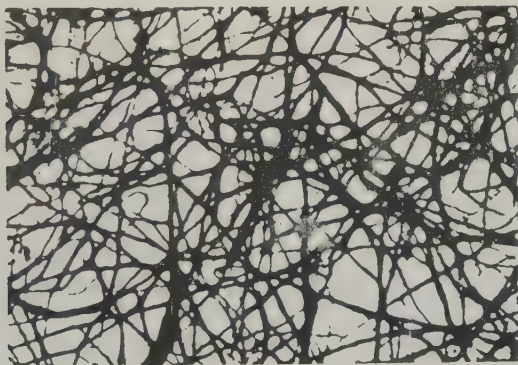


Abb. 2: Fibrin-Gerinnsel, kontrastiert mit Uranylacetat, Originalvergrößerung 10.000 x
 ——— 1 μ m

det. Dieses ist noch in Harnstoff- oder Essigsäurelösungen löslich. Im weiteren Verlauf der Blutgerinnung werden dann unter der Einwirkung des Faktors XIII (6) kovalente Bindungen geknüpft, die das Gerinnsel stabilisieren und unlöslich machen.

1954 wurde von Burstein (7) gezeigt, daß Gerinnsel, die aus Nabelschnurblut erhalten werden, eine höhere Transparenz und eine geringere Kompressibilität besitzen als Fibrin-Gerinnsel aus normalem Erwachsenenblut. Dies wird vermutlich durch die veränderten gerinnungsphysiologischen Eigenschaften des fetalen Fibrinogens bewirkt. Die Existenz einer solchen molekularen Variante wurde von Künzer (8) postuliert und inzwischen durch die Analyse

einiger seiner gegenüber dem adulten Fibrinogen andersartigen molekularen Eigenschaften nachgewiesen (9 - 12)

2.2. Aufgabenstellung

Im folgenden soll gezeigt werden, daß die beiden molekularen Varianten "adultes und fetales Fibrinogen" sich bei der Gerinnung zu strukturell unterschiedlichen Fibrin-Polymeren vernetzen.

Die hierzu erforderlichen Versuche werden mit hochgereinigtem Fibrinogen durchgeführt, damit etwaige Einflüsse anderer Faktoren ausgeschlossen werden. Außerdem werden dadurch auch Konzentrationsunterschiede ausgeglichen, denn im Blut des Erwachsenen ist die Fibrinogenkonzentration höher als im Neugeborenenblut (13). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Gerinnsel sollen dann morphometrisch auf unterschiedliche Strukturparameter untersucht werden.

2.3. Methoden

Es werden die angewandten Arbeitsmethoden zur Isolierung von fetalem und adultem Fibrinogen und zur Präparation der Fibringerinnsel für die Elektronenmikroskopie beschrieben.

2.3.1. Präparation von fetalem Fibrinogen

Hochgereinigtes humanes Fibrinogen wird nach der Methode von Osbahr (14) hergestellt. Fetales Fibrinogen wird nach dem gleichen Verfahren aus dem Blut der Nabelschnur von Neugeborenen isoliert.

2.3.1.1. Materialien

Zur Präparation wird folgendes benötigt:

ACD-Stabilisator USP XVII B

96 %iger Äthanol, unvergällt

0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,4 aus 0,1 M KH_2PO_4 , 0,1 M K_2HPO_4

Ammoniumsulfatlösung, gesättigt

0,3 M Kaliumchloridlösung

0,1 M ϵ -Aminocapronsäure in ACD-Stabilisator

2,5 %ige Ammoniaklösung

Chloroform

Siliconöl AK 350

Precimat

LaB-Trol

Rinder-Thrombin

2.3.1.2. Arbeitsvorschrift

Glasröhrchen werden mit einer 2 %igen Lösung von Siliconöl in Chloroform siliconisiert. Dies verhindert eine Zerstörung der Thrombozyten und damit eine Freisetzung von Thrombozyten-Fibrinogen. In diese Glasröhrchen, in denen ACD- ϵ -Aminocapronsäurelösung vorgelegt wird, wird Nabelschnurblut gefüllt und durch sofortiges Mischen die Gerinnung verhindert. Zur Gewinnung des Plasmas wird 20 min mit 3000·g zentrifugiert und anschließend vom Blutkuchen dekantiert. Für eine Präparation werden auf diese Weise etwa 300 ml gesammelt. Das Plasma wird dann noch einmal 10 min mit 1800·g zentrifugiert und vom Sediment abgegossen. Nach Kühlung auf + 4°C wird unter vorsichtigem Plümpern 96 %iger Alkohol gleicher Temperatur langsam zum Plasma gegeben, bis eine Endkonzentration von 8 % Äthanol erreicht ist. Die Fällung ist nach 10 min beendet. Zur Abtrennung wird 10 min mit 3000·g zentrifugiert. Das Sediment wird in einem Becherglas in 25 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,4 aufgenommen und unter Rühren mit 25 ml bidestilliertem Wasser verdünnt. Die homogene Suspension wird über Nacht bei + 4°C stehen gelassen. Danach wird 20 min mit 3000·g zentrifugiert. Das Sediment wird verworfen. Zum Überstand wird 1/3 seines Volumens einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung unter Plümpern zugegeben. Die Fällung bleibt 10 min stehen, danach wird 15 min mit 1800 g zentrifugiert. Das Sediment wird in 6 - 10 ml 0,3 M Ka-

liumchloridlösung aufgenommen und mit 2,5 %iger Ammoniaklösung auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wird 96 h bei + 2°C gegen etwa 10 l einer 0,3 M Kaliumchloridlösung dialysiert.

2.3.2. Präparation von adultem Fibrinogen

Zur Gewinnung von humanem, adultem Fibrinogen dienen als Ausgangsmaterial Blutkonserven, die auf silikonisierte Zentrifugenröhrchen verteilt, weiterhin wie in 2.3.1.2. beschrieben, verarbeitet werden.

Die bei den Präparationen anfallenden Fibrinogen-Dialysate werden entweder direkt weiterverarbeitet oder lyophilisiert. In Lösung zeigt das Fibrinogen auch bei tiefen Temperaturen schon nach wenigen Tagen eine Tendenz zur Polymerisation.

2.3.3. Bestimmung der Reinheit der Fibrinogenpräparation

Der Gehalt an Protein in den Fibrinogenlösungen nach der Dialyse wird durch die Biuretreaktion (15) bestimmt. Als Vergleichsproteine werden Precimat und LaB-Trol verwendet. Der gerinnbare Anteil wird bestimmt, indem dieser mit Rinder-Thrombin ausgefällt wird und im Überstand der Gehalt an Eiweiß bestimmt wird (16). Der Gehalt an gerinnbarem Fibrinogen beträgt bei allen Präparationen 97 - 98 %.

2.3.4. Elektronenmikroskopische Untersuchung von Fibringerinnsele

Die Präparation der Fibrinnetze erfolgt mit einigen Abwandlungen nach dem von Kay und Cuddigan (17) beschriebenen Verfahren:

2.3.4.1. Materialien

Zur Präparation und Auswertung werden folgende Reagenzien und Materialien verwendet:

0,1 N Kaliumchloridlösung

0,9 % Natriumchloridlösung

1,0 % Uranylacetatlösung

1,2 % Formvar in Chloroform

Thrombinlösung, 50 NIH-Einheiten/ml Rinder-Thrombin,
Behringwerke AG, Marburg

Als Trägermaterial werden Kupfernetze square type 200,
Veco GmbH, Solingen, verwendet.

Fotografiert wird mit Agfa Scientia Film, 23 D 56 AH,
7 x 7 cm; entwickelt mit Kodak D-19 Entwickler; ver-
größert auf Agfa Brovira BH 112, 18 x 24 cm.

2.3.4.2. Präparation der Fibrin-Gerinnsel

Bei 25°C wird lyophilisiertes Fibrinogen in 0,1 M Kalium-
chloridlösung zu einer Konzentration von 5 mg/ml gelöst,
beziehungsweise frisch präpariertes und dialysiertes Fi-
brinogen zur gleichen Konzentration verdünnt. Ein Tropfen
der Lösung wird auf ein mit Formvar-Folie überzogenes Kup-
fernetz gegeben und mit Filtrierpapier bis fast zur Trock-
ne abgesaugt. Danach wird ein Tropfen Thrombinlösung (50
NIH-Einheiten/ml) zugegeben. Nach zwei Minuten wird die
Reaktion mit 0,9%iger Natriumchloridlösung gestoppt. Durch
drei aufeinanderfolgende Tropfen einer 1%igen Uranylace-
tatlösung wird das Gerinnsel kontrastiert. Anschließend
wird mit bidestilliertem Wasser gespült. Die Grids wer-
den danach an der Luft getrocknet. Von verschiedenen
Fibrinogen-Präparationen werden auf diese Weise je Prä-
paration zwanzig Grids hergestellt, für die gerade 1 ml
Fibrinogenlösung und 1,2 ml Thrombinlösung ausreichend
sind.

2.3.4.3. Elektronenmikroskopie

Die nach obiger Arbeitsvorschrift erhaltenen Grids mit
Fibrinnetzen werden mit einem Zeiss-Elektronenmikros-
kop EM 9 A untersucht und fotografiert. Gut haftende
und auszuwertende Fibrinnetze werden bei nur etwa 50 -
60 % der Grids gefunden. Von jeder Fibrin-Präparation
werden 20 Aufnahmen bei 6.000facher Vergrößerung her-
gestellt, pro verwertbarem Grid einer Präparation also
etwa zwei Aufnahmen.

2.3.5. Morphometrische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Aufnahmen ist eine genügend große Zahl von Meßwerten erforderlich. Um diese zu erhalten, werden von jeder Aufnahme zwei Ausschnitte auf ein Format von 18 x 24 cm vergrößert. In diese Vergrößerungen wird im gleichen Arbeitsgang ein Gitternetz mit 5 mm Kantenlänge einkopiert. Die so erhaltenen Bilder der Fibrinnetze haben jetzt eine 45.000fache Endvergrößerung. Sie werden morphometrisch wie bei Krause und Zimmermann (18) nach den Grundlagen von Weibel (19) ausgewertet.

Zur Bestimmung der Dichte der Fibrinnetze werden zunächst die Punkte gezählt, bei denen ein Kreuzungspunkt aus zwei oder mehr Fibrinfasern genau mit einem Gitternetzpunkt zusammenfällt. Abbildung 3 zeigt dies in einer

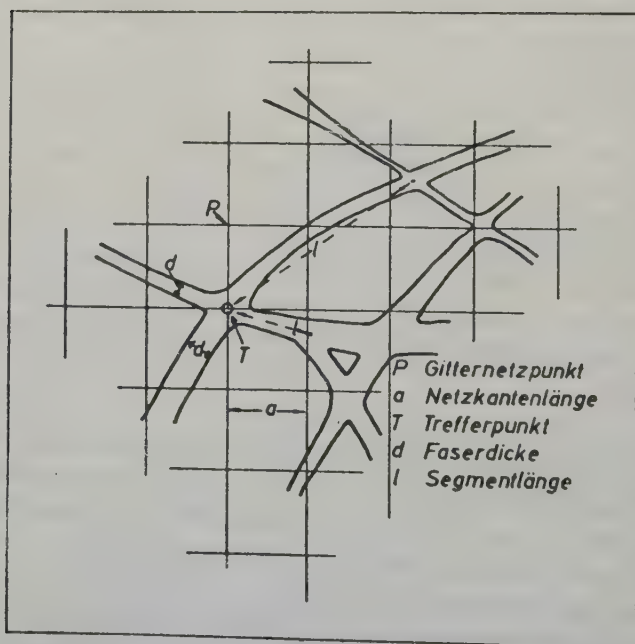


Abb. 3: Schematische Darstellung zur Auswertung der Fibringerinnsel

schematischen Darstellung. Daraus erhält man die Zahl der Trefferpunkte (T). In der Nähe dieser Trefferpunkte wird zur Bestimmung der Faserdicke mit einem Fadenzähler die Dicke (d) von jeweils zwei Fibrinfasern pro Trefferpunkt gemessen. Die Länge (l) einer Fibrinfaser zwischen einem Trefferpunkt und dem nächsten Kreuzungs- oder Verzweigungspunkt im Fibrinnetz wird mit einer Schiebelehre gemessen. Von jedem Trefferpunkt ausgehend werden ebenfalls zwei Faserlängen bestimmt.

Insgesamt werden so viele Aufnahmen ausgewertet, daß für Faserdicke und Faserlänge zu jeder Fibrinpräparation mindestens 500 Meßwerte zur Verfügung stehen. Die Meßwerte für die Faserdicke werden in Klassen zu je 0,5 nm und für die Segmentlänge in Klassen zu je 5 nm eingeteilt.

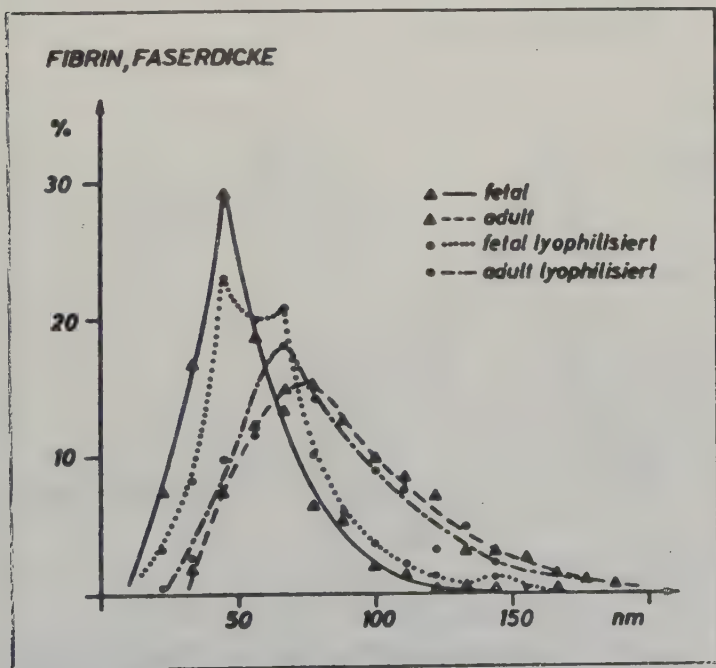


Abb. 4: Häufigkeitsverteilung der Faserdicken bei den verschiedenen Fibrin-Präparationen

Ausgewertet werden die Fibrinnetze aus den Fibrinogen-Präparationen

- A adultes Fibrinogen, dialysiert
- A_L adultes Fibrinogen, dialysiert und lyophilisiert
- F fetales Fibrinogen, dialysiert
- F_L fetales Fibrinogen, dialysiert und lyophilisiert

Die Verteilung der prozentualen Häufigkeit der gemessenen Faserdicken und die Mittelwerte unter Berücksichtigung der Endvergrößerung ist aus Tabelle 1 ersichtlich, die in Abbildung 4 graphisch dargestellt ist.

Tabelle 2 und Abbildung 5 zeigen analog die Verteilung der Segmentlängen (1) der Fibrinfasern.

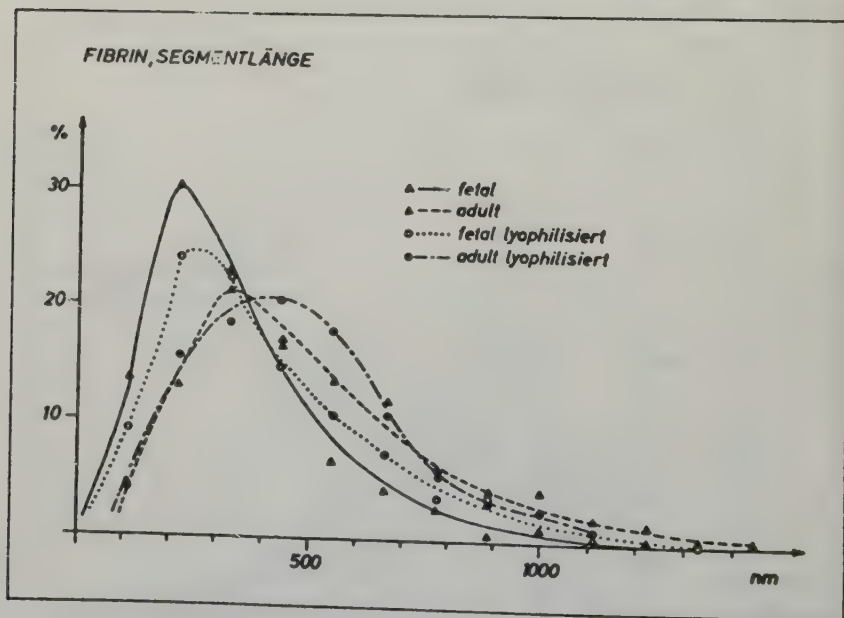


Abb. 5: Häufigkeitsverteilung der Faserlängen bei den verschiedenen Fibrin-Präparationen

d mm	d* mm	A %	A _L %	F %	F _L %
1,0	22	-	0,2	7,3	3,2
1,5	33	1,7	2,5	16,6	8,2
2,0	44	7,3	9,8	29,2	23,1
2,5	56	12,1	11,4	18,5	19,9
3,0	67	14,8	18,2	13,2	20,8
3,5	78	15,2	14,1	6,3	10,0
4,0	89	12,5	12,6	5,1	5,9
4,5	100	9,8	8,9	1,8	3,6
5,0	111	8,3	7,7	1,2	2,2
5,5	122	6,9	2,9	0,2	1,3
6,0	133	2,9	4,9	0,4	0,4
6,5	144	2,9	2,2	0,2	1,1
7,0	156	2,5	2,5	-	0,4
7,5	167	1,3	1,2	-	0,2
8,0	178	1,0	0,7	-	-
8,5	189	0,6	0,3	-	-
9,0	200	-	-	-	-
9,5	211	0,2	-	-	-
10,0	222	-	0,2	-	-
10,5	233	-	-	-	-
11,0	244	-	-	-	-
11,5	256	0,2	-	-	-
n		521	594	507	559
$\bar{d}$ mm		88	85	53	62

Tab. 1: Häufigkeitsverteilung der Faserdicken bei
 den verschiedenen Fiprinpräparationen
 n = Summe der Einzelmessungen
 d = gemessene Faserdicke
 d* = Faserdicke unter Berücksichtigung der
 Endvergrößerung

l mm'	F* nm	A %	A _L %	F %	F _L %
5	111	4,5	4,4	13,6	9,2
10	222	13,1	15,6	30,3	24,1
15	333	21,2	18,2	23,0	22,5
20	444	16,5	20,5	17,0	14,6
25	556	13,5	17,9	6,6	10,5
30	667	11,8	10,5	4,3	7,3
35	778	6,1	5,3	2,6	3,6
40	889	4,3	3,2	0,5	3,7
45	1000	4,3	2,6	1,1	2,6
50	1111	2,0	1,2	0,7	1,0
55	1222	1,6	0,3	0,2	0,3
60	1333	0,4	0,2	-	0,2
65	1444	0,4	0,2	0,2	0,2
70	1556	0,4	-	-	-
75	1667	-	0,2	-	0,2
80	1778	-	-	-	-
85	1889	-	-	-	0,2
n		510	660	610	618
$\bar{l}$ nm		520	480	350	420

Tab. 2: Häufigkeitsverteilung der Segmentlängen der Fibrinfasern bei den verschiedenen Fibrinpräparationen

n = Summe der Einzelmessungen

l = gemessene Faserlänge

l* = Faserlänge unter Berücksichtigung der Endvergrößerung

Die Dichte der Vernetzung bei den einzelnen Fibrin-Präparationen läßt sich als Anteil an der Einheitsfläche aus der Zahl der Trefferpunkte und dem zur morphometrischen Auswertung zugrundegelegten Gitternetz errechnen nach

$$D = \frac{\bar{T} a^2}{P} \quad (3)$$

In dieser Beziehung bedeuten

D = Dichte des Netzes

$\bar{T}$ = mittlere Trefferzahl pro Gitternetz
und Aufnahme

a = Netzkantenlänge = 5 mm

P = Zahl der Gitternetzpunkte = 1564

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Präparation	ΣT	$\bar{T}$	D [%]
A	251	19,3	31
A _L	318	18,7	30
F	308	30,8	49
F _L	287	22,8	35

Tab. 3: Dichte D der Fibrinnetze aus den verschiedenen Präparationen bezogen auf die Einheitsfläche von 1 mm²

2.3.6. Signifikanztest

Um signifikante Unterschiede zwischen den Faserdicken und Segmentlängen von adultem und fetalem Fibrin aufzuzeigen, werden die Meßwerte mit Hilfe des F-Testes und des Behrens-Fisher-Testes bei einer Irrtumswahr-

scheinlichkeit von 5 % untersucht (20).

Die Berechnung des Varianzverhältnisses F erfolgt nach

$$F_b = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (4)$$

mit den Varianzen

$$s^2 = \frac{\sum f x^2 - \frac{1}{n} (\sum f x)^2}{n - 1} \quad (5)$$

Hierin ist n die Gesamtzahl der Meßwerte einer Präparation und f die Häufigkeit eines Meßwertes x in einer Klasse. Den Berechnungen werden die mit Fadenzähler beziehungsweise Schiebelehre gemessenen Werte x in mm zugrunde gelegt. Die für die beiden Signifikanzteste benötigten Rechengrößen sind in Tabelle 4 für die Faserdicke und für die Segmentlänge in Tabelle 5 zusammengestellt.

Präparation	n	$\sum x$	$\sum x^2$	$\bar{x}$	s^2	s
A	521	2074,5	9427,25	3,9	2,24	1,50
A_L	594	2255,5	9812,25	3,8	2,10	1,45
F	507	1277,5	3293,25	2,4	0,15	0,39
F_L	559	1559,5	4985,75	2,8	1,14	1,07

Tab. 4: Wertetabelle zu den Signifikanztesten für die Faserdicke

Das aus den Meßwerten berechnete Varianzverhältnis F_b wird mit der Nullhypothese H_0 auf Signifikanz geprüft.

$$H_0: F_b = F_0 \quad (6)$$

Präparation	n	Σx	Σx^2	$\bar{x}$	s^2	s
A	510	11895	354675	23,3	151,75	12,32
A _L	660	14235	378275	21,6	108,12	10,40
F	610	8640	197900	15,6	124,01	11,14
F _L	618	11745	303475	19,0	130,09	11,41

Tab. 5: Wertetabelle zu den Signifikanztesten
für die Segmentlänge

Der Wert F_0 für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % wird aus der tabellierten F-Verteilung von Snedecor (21) entnommen. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Fibrinpräparationen bestehen dann, wenn

$$F_b \geq F_0 \quad (7)$$

ist. Die Werte für F_b sind in Tabelle 6 aufgeführt. Sie sind unterstrichen, wenn für sie die Nullhypothese (Gleichung 6) angenommen werden kann, das heißt, daß keine signifikanten Unterschiede nach Gleichung 7 auftreten.

Da die Varianzen der einzelnen Meßreihen ungleich sind, kann Students-t-Test hier nicht angewandt werden. Es wird deshalb der Behrens-Fisher-Test mit Hilfe der hier für gültigen Beziehung

$$t_b = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (8)$$

Faserdicke			Segmentlänge	
Testpaar	F_b	t_b	F_b	t_b
A, A _L	<u>1,07</u>	<u>1,13</u>	1,40	3,17
A, F	14,93	22,13	1,22	10,88
A, F _L	1,96	13,82	1,17	6,03
F, A _L	14,00	22,62	1,15	9,90
A _L , F _L	1,84	13,39	1,20	4,25
F, F _L	7,60	8,28	<u>1,05</u>	5,29
$F_o = 1,13$				
$t_o = 1,96$				

Tab. 6: Ergebnisse der Signifikanztests

durchgeführt. Dieses Verfahren geht zwar von Fiduzialwahrscheinlichkeiten aus, ergibt sich jedoch bei ungleichen Varianzen aus den selben Annahmen, die bei gleichen Varianzen zum t-Test führen. Es kann deshalb nach Lindley (22) an dessen Stelle verwendet werden. Die berechneten Werte t_b werden wie beim F-Test mit der Nullhypothese

$$H_o : t_b = t_o \quad (9)$$

überprüft. Der Wert für t_o wird aus der Tabelle von Fisher und Yates (23) für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % entnommen. Die Mittelwerte $\bar{x}$ sind in den Tabellen 4 und 5 mit aufgeführt. Die berechneten Werte

t_b zeigt Tabelle 6 im Vergleich mit den Werten aus dem F-Test. Auch bei den t_b -Werten sind diejenigen unterstrichen, die nach der Nullhypothese angenommen werden müssen.

2.4. Ergebnisse und Diskussion

Die mit den im Vorangehenden beschriebenen Methoden erhaltenen Ergebnisse lassen sich zu folgendem Gesamtbild zusammenfassen:

Fibrin, welches aus frisch präpariertem adulten Fibrinogen entsteht, unterscheidet sich eindeutig von fetalem Fibrin, das auf die gleiche Weise präpariert wird. Dies ist bereits bei der makroskopischen Betrachtung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennbar, die in Abbildung 6 für adultes, fetales und fetales lyophilisiertes Fibrin verglichen werden.

Das Netzwerk des fetalen Fibrins hat mit 49 % eine wesentlich höhere Dichte als das des adulten Fibrins (31%), wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist. Dies ist zur Verdeutlichung noch einmal in Abbildung 7 dargestellt.

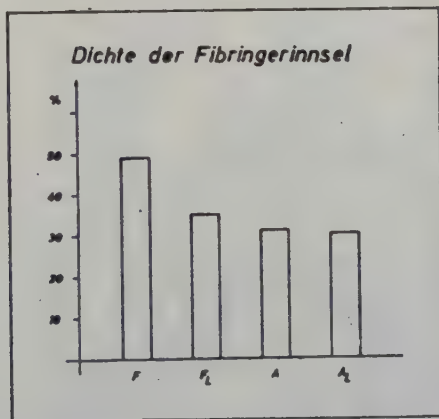


Abb. 7: Anteil des Fibrinnetzes an der Einheitsfläche von 1 mm^2

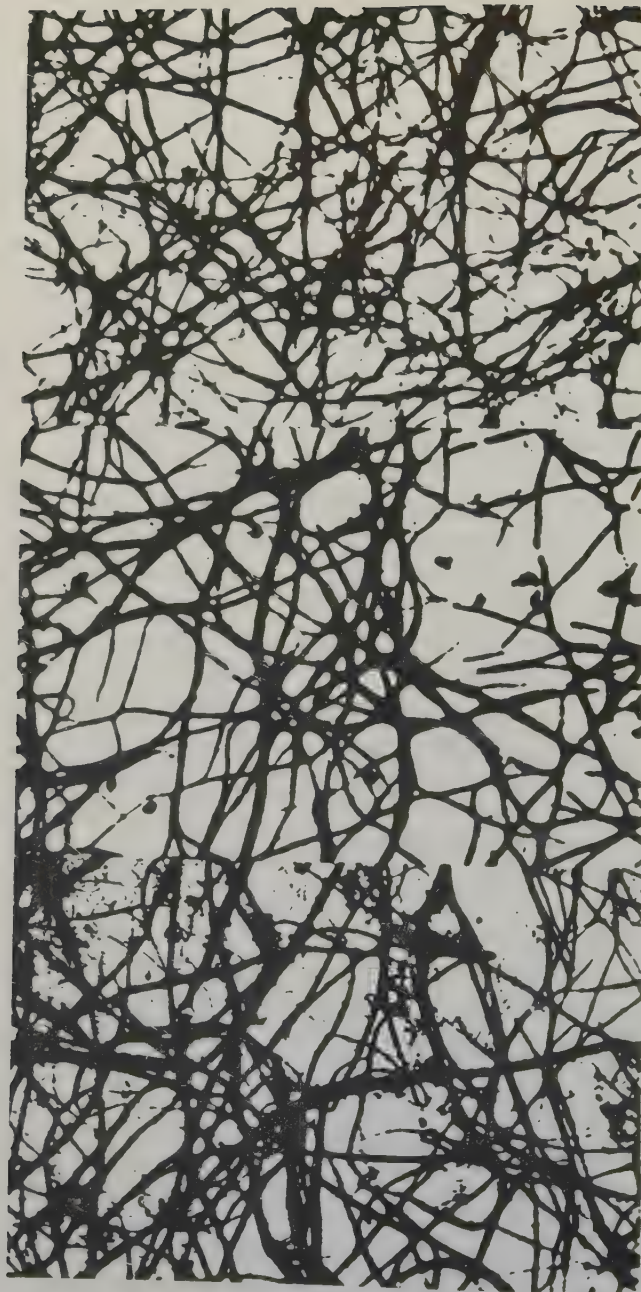


Abb. 6:
Fibringerinnung
Endvergrößerung
12500 x,
— = 1 μ m.

fetales Fibrin

adultes Fibrin

fetales Fibrin
aus lyophilisi-
tem Fibrinogen

Auch die Faserdicke zeigt signifikante Unterschiede. Abbildung 8 verdeutlicht dies noch einmal. Fetales Fibrin hat mit 29 % eine maximale Häufigkeit der Faserdicke bei 45 nm. Der Mittelwert liegt bei 53 nm. Adulte Fasern sind mit einem Mittelwert von 88 nm fast doppelt so dick. Das Maximum der Verteilung liegt mit 15 % bei 80 nm.

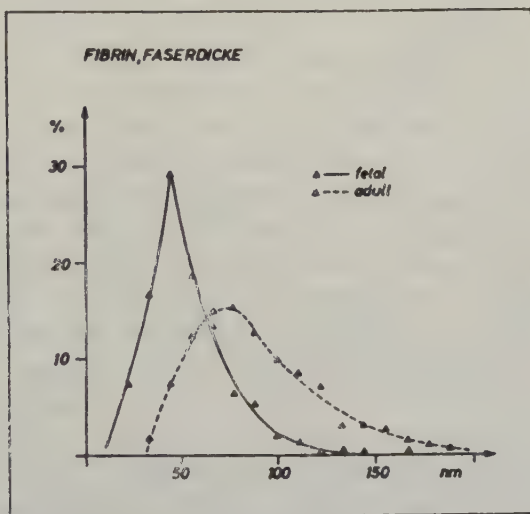


Abb. 8: Häufigkeitsverteilung der Faserdicken von adultem und fetalem Fibrin

Analog verhält es sich mit der Länge der Fibrinfasern zwischen zwei Vernetzungspunkten, wie es Abbildung 9 zeigt. Fetale Fasern sind im Mittel 350 nm lang. Das Maximum von 30 % liegt bei 220 nm. Bei adultem Fibrin sind die Fasern mit einem Mittelwert von 520 nm wieder wesentlich länger als die fetalen Fasern. Der Maximalwert der Häufigkeitsverteilung von nur 21 % liegt hier bei 330 nm.

Die Differenzierung der Fibringerinnung in zwei unterschiedliche Erscheinungsformen hat sich also bestätigt, wie es nach den Ausführungen in 2.1. und 2.2. erwartet wurde.

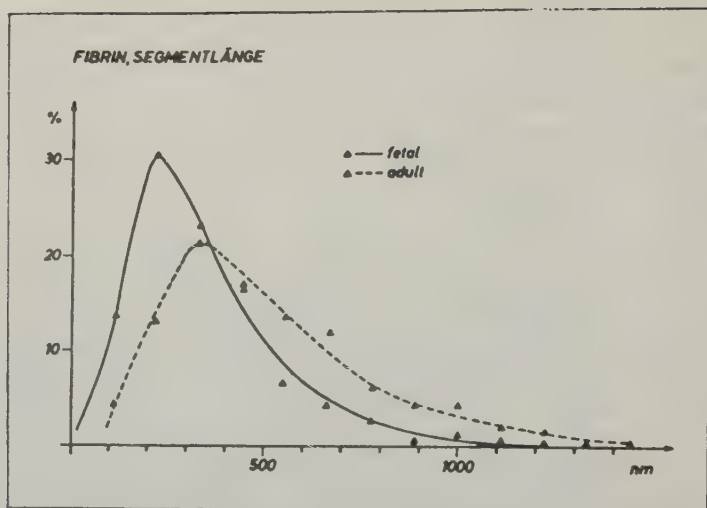


Abb. 9: Häufigkeitsverteilung der Segmentlängen von adultem und fetalem Fibrin

Ein unerwartetes Verhalten zeigt die Gerinnung von Fibrinogen, welches zuvor gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert worden war. Besonders auffällig ist dies bei fetalem Fibrinogen. Der Anteil des Fibrinnetzes an der Einheitsfläche ist geringer geworden und liegt mit 35 % (Abbildung 7) zwischen fetalem und adultem Fibrin näher bei letzterem. Aus Abbildung 6 ist bereits zu erkennen, daß der Anteil an dickeren Fasern gegenüber dem nicht-lyophilisierten Material zugenommen hat. Nach der morphometrischen Auswertung wird eine zweigipfelige Verteilung gefunden, deren Maximalwerte von 23 % und 20 % mit den Maxima der Verteilungen von adultem und fetalem Fibrin übereinstimmen, wie aus Abbildung 4 zu ersehen ist. Die Unterschiede sind nach Tabelle 6 signifikant. Für die Segmentlängenverteilung ergibt sich aus dieser Tabelle kein signifikanter Unterschied. Beim Behrens-Fischer-Test muß jedoch die Nullhypothese sogar noch bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von nur 0,1 % mit

$t_0 = 3,31$ verworfen werden, und die Unterschiede sind damit als hochsignifikant anzusehen.

Fetales Fibrinogen verliert also durch die Gefriertrocknung einen Teil seiner charakteristischen Eigenschaften: Das resultierende Fibringerinnsel nähert sich im Habitus dem adulten Fibrin.

Letzteres zeigt auch bei der Gerinnung einer lyophilisierten Präparation keine Änderung in der Dichte des Netzes (Abbildung 7) und nach Tabelle 6 auch keine signifikanten Unterschiede in der Faserdicke. Nur die Faserlänge weist signifikante Unterschiede auf, liegt jedoch mit 480 nm relativ nahe bei den 520 nm des nicht-lyophilisierten Ausgangsmaterials. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1 % wären diese Unterschiede nicht mehr signifikant. Da die Unterschiede zu gering sind, wird auch durch eine Wiederholung der Versuche mit weiteren Präparationen nach diesem Verfahren keine sichere Aussage darüber zu erhalten sein, ob beim adulten Fibrinogen durch Gefriertrocknung eine Veränderung des Fibrinnetzes auftritt. Beim fetalen Fibrin sind die Veränderungen schon beim Betrachten der Gerinnsel erkennbar. Das charakteristische Aussehen der Fibrinnetze wurde auch bei weiteren Präparationen mit fetalem frischen und lyophilisiertem Fibrinogen gefunden. Wegen des enormen Zeitaufwandes wurde deshalb auf eine weitere Auswertung verzichtet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß fetales Fibrinogen ein vom adulten deutlich unterschiedenes Fibrinnetz aufbaut und durch Lyophilisation einen Teil seiner charakteristischen Eigenschaften verliert. Die Ursachen dieser Erscheinungen lassen sich bisher nicht erklären und benötigen weiterführende Untersuchungen zu ihrer Interpretation.

Für adultes Fibrinogen läßt sich mit diesen Methoden keine Aussage darüber machen, ob auch in diesem Fall durch Lyophilisation eine Änderung der Gerinnungseigenschaften hervorgerufen wird.

Durch Lichtstreuungsmessungen während der Gerinnung

von Fibrinogen in sehr verdünnten Lösungen (24) wurde inzwischen auch für das adulte Fibrinogen der gleiche Effekt der Veränderung der Gerinnbarkeit durch Lyophilisation nachgewiesen. Alle Ergebnisse dieser Untersuchungen sind noch einmal in Tabelle 7 zusammengefaßt:

	<u>Fibrinpräparation</u>			
	adult	adult lyo.	fetal	fetal lyo.
<u>Faserdicke</u> $\bar{d}$ nm	88	85	53	62
$d_{\max}$ nm	80	70	40	40 + 70
max. Häufigkeit %	15	18	30	23 + 21
<u>Faserlänge</u> $\bar{l}$ nm	520	480	350	420
$l_{\max}$ nm	330	440	220	220
max. Häufigkeit %	21	21	30	24
<u>Dichte</u> %, bezogen auf 1 mm^2 Einheitsfläche	31	30	49	35

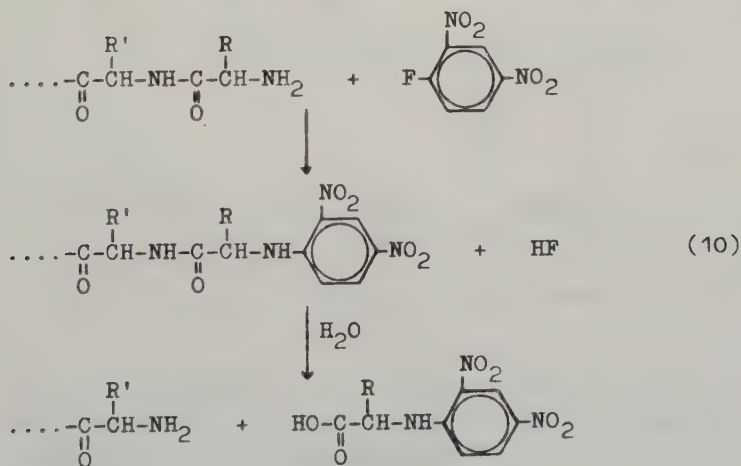
Tab. 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen
 lyo. = Präparation aus lyophilisiertem Fibrinogen

3. Automatischer Edman-Abbau

=====

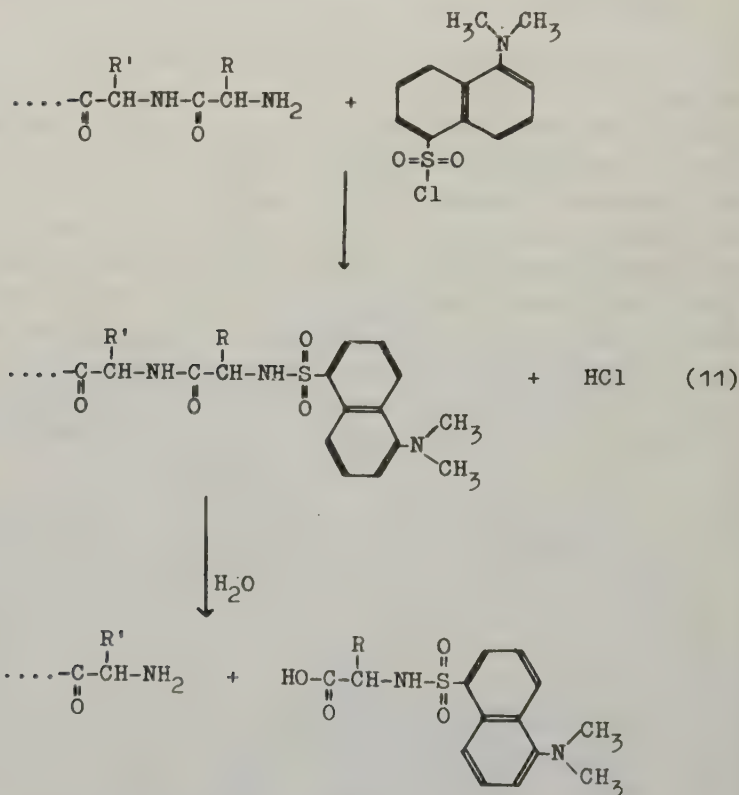
3.1. Grundlagen

Das Verständnis physiologischer Reaktionen setzt eine genaue Kenntnis der Struktur der beteiligten Proteine voraus. Der wichtigste Schritt auf dem Weg zur Aufklärung der gesamten räumlichen Anordnung ist dabei die Bestimmung der Reihenfolge der Aminosäuren im Grundgerüst der Proteine: die Festlegung der Primärstruktur. Die bahnbrechende Arbeit auf diesem Gebiet wurde von Sanger geleistet. Ihm gelang es, die Aminosäure mit einer freien NH_2 -Gruppe am Anfang einer Peptidkette mit Dinitrofluorbenzol (DNF) nach Reaktionsgleichung 10 (25) umzusetzen, durch schonende Hydrolyse die entstandene Dinitrophenylaminosäure abzuspalten und zu bestimmen.



Zehnjährige Arbeit nach dieser Methode führte 1952 zur Aufklärung der Struktur des Insulins (26). Diese Techniken wurden in der Folgezeit rasch verbessert. Durch Einführung von 1-dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid (Dansylierung) von Hartley (27) nach

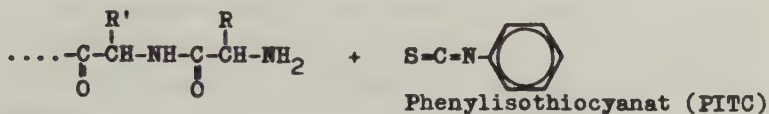
der Reaktionsgleichung 11 werden Dansyl-Aminosäuren erhalten. Sie fluoreszieren stark und gestatten einen hundertfach empfindlicheren Nachweis. Es sind noch geringere Mengen als 1 nmol nachweisbar.



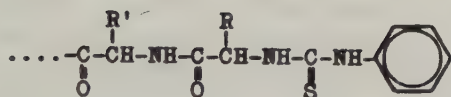
Neben verschiedenen anderen chemischen Reaktionen und dem enzymatischen Abbau mit Aminopeptidasen (28) ist die Reaktion der N-terminalen Aminosäure mit Phenylsenföl die wichtigste. Mit ihrer Hilfe gelang Edman 1967 (29) eine weitgehende Automatisierung des Proteinabbaus nach dem Reaktionsmechanismus, der in Reaktionsgleichung 12 beschrieben ist.

Das abzubauen Protein wird an der Wandung eines rotierenden Reaktionsgefäßes verteilt und unter Stick-

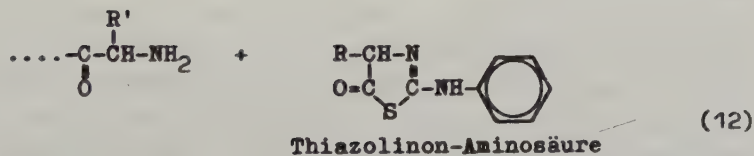
stoffatmosphäre oder Hochvakuum mit den erforderlichen Reagenzien und Lösungsmitteln nacheinander versetzt: Alle Reaktionen laufen in "Liquid-Phase" ab. Zur Erzie-



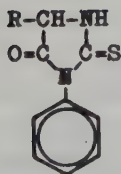
↓ pH 9 - 9,5



↓ $\text{CF}_3 - \text{CF}_2 - \text{CF}_2 - \text{COOH}$ Heptafluorbuttersäure (HFBA)



↓



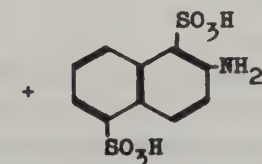
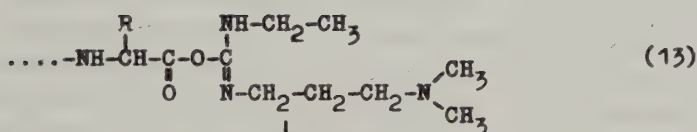
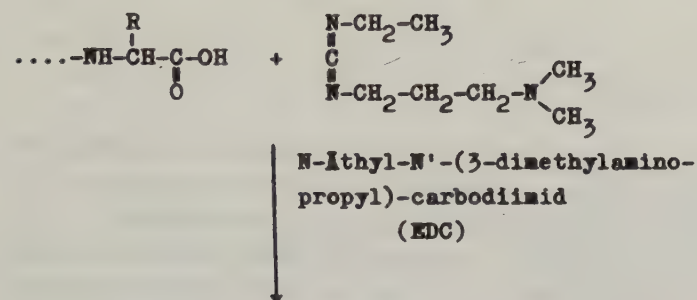
Phenylthiohydantoin (PTH)-
Aminosäure

lung guter Ausbeuten in möglichst vielen Abbauschritten ist die Ausbildung eines stabilen und homogenen Proteinfilms an der Wandung des Reaktionsgefäßes erforderlich.

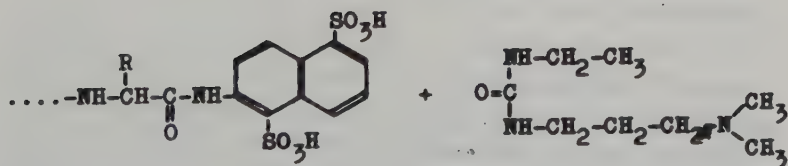
Eine Limitierung des Abbaus erfolgt dadurch, daß die Abspaltung der jeweiligen N-terminalen Aminosäure nach der Reaktionsgleichung 12 mehr oder weniger vollständig abläuft. Es tritt ein "Overlap" der vorhergehenden Aminosäure im darauffolgenden Abbauschritt auf und erschwert die Zuordnung der Aminosäuren zu ihren Positionen in der Sequenz durch kontinuierlich abnehmende Ausbeuten und zunehmende Overlaps. Durch Waschen des Proteins mit Lösungsmitteln zur Entfernung von Nebenprodukten und Reagenzien werden außerdem immer geringe Mengen des Proteins mit ausgewaschen. Der Grad der Auswaschung ist abhängig von der Länge und der Zusammensetzung der verbleibenden Peptidkette. Je kürzer und saurer diese ist, desto leichter wird sie von den Lösungsmitteln eluiert. Diese limitierenden Faktoren lassen sich durch die geeignete Wahl von Lösungsmitteln und Puffersystemen und die optimale Programmierung des Reaktionsablaufs beeinflussen.

Die Auswaschung von kurzen Peptiden läßt sich gut in "Solid-Phase-Sequencatoren" verhindern. In ihnen wird die Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure mit einer Amid- oder Estergruppe einer geeigneten Polystyrolmatrix gekuppelt (30). Mit einem "Liquid-Phase-Sequencator" lassen sich kleine Peptide ebenfalls bis zur C-terminalen Aminosäure abbauen. Man kann dazu das Peptid ebenfalls an eine Polystyrolmatrix koppeln und mit einem geeigneten Programm und den entsprechenden Lösungsmitteln und Reagenzien abbauen (31). Eine andere Möglichkeit besteht darin, das Peptid durch den Einbau einer hydrophilen Gruppe zu modifizieren. Nach der Carbodiimid-Methode zur Peptidsynthese von Sheehan et al. (32) läßt sich β -Naphthylamindisulfonsäure über eine Amidbindung an alle freien Carboxylgruppen des Peptids binden. Der Reaktionsablauf nach Gleichung 13 ist nach dem

Verfahren von Foster et al. (33) mit sehr gutem Erfolg auch an größeren Peptiden wie der A-Kette von Insulin und Spaltstücken aus Proteinaseinhibitoren und Fibrinogen durchgeführt worden.



2-Aminonaphtalin-1,5-disulfon-
säure (ANS)



Peptidynaphtalindisulfonsäure

3.2. Aufgabenstellung

Im folgenden soll gezeigt werden, welche Programme und Methoden zur Optimierung der automatischen Sequenzierung entwickelt und benutzt wurden.

3.3. Sequenator

Der automatische Edman-Abbau von Proteinen und Peptiden erfolgt im Sequenator-Modell Spinco 890 C Sequencer, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, California. Die bei jedem Abbauschritt anfallenden Thiazolinon-Derivate der Aminosäuren werden im Fraktionensammler des Gerätes aufgefangen, eingeeengt und auf 4°C gekühlt. Die Umlagerung zu Phenylthiohydantoin-Aminosäuren erfolgt manuell nach den unter Methoden angegebenen Verfahren. Thiazolinonderivate von Serin, Glycin, Threonin und Arginin werden in der Literatur als sehr instabil bezeichnet und sollten deshalb so rasch wie möglich konvertiert werden. Bei der programmierten Trocknung und Kühlung im Fraktionensammler sind bei einer maximalen Verweilzeit von 12 h (über Nacht) für diese Aminosäuren Verluste von 35 % festgestellt worden. Dies ist gerade noch vertretbar, wenn die Overlaps nicht zu groß und die Gesamtausbeute nicht zu gering werden. Die Trocknung im Fraktionensammler ist allerdings eine zusätzliche Belastung für das Vakuumsystem des Gerätes. Besonders nachteilig wirkt sich dabei das Fehlen von Kühlfallen vor den Hochvakuumumpen aus. Nach der Umstellung auf das System des flüchtigen DMBA-Puffers traten deshalb schwere Störungen im Betrieb auf, da der größte Teil der Reagenzien und Lösungsmittel mit den Ölpumpen abgesaugt wird. In den Pumpen bilden sich schwerlösliche Kondensationsprodukte, die Exzenter, Welle, Schieber und Federn verkleben und schließlich die Pumpe blockieren. Da ein nachträglicher Einbau von

Kühlfallen zwar die eleganteste Lösung ist, zur Zeit jedoch zu aufwendig erscheint, wurde ein spezielles Reinigungsverfahren erprobt, welches sich sehr gut bewährt. Das Pumpenöl wird hierzu nach jedem Sequenzierlauf bei stehenden Pumpen abgelassen. Die Pumpen werden dann mit Aceton gefüllt und für 30 sec laufen gelassen. Im Stand wird danach das Aceton abgelassen und wieder Vakuumpumpenöl eingefüllt. Nach einer Laufzeit von etwa drei Stunden wird wieder ein Vakuum von 30 - 50 mTorr erreicht. Die Pumpen sind bei dieser Wartung seit einem Jahr ununterbrochen und störungsfrei in Betrieb. Nur die Radialdichtung am Antriebsrad wird durch Aceton angegriffen und muß in Abständen von circa sechs Monaten erneuert werden.

Lösungsmittel und Reagenzien kondensieren auch bereits in den Ventilen und Vakuumschläuchen zwischen Reaktionsgefäß und Pumpen. Sie müssen deshalb in Abständen von drei Monaten zerlegt und gereinigt werden.

3.4. Methoden

Es werden die für eine Sequenzierung benötigten Reagenzien und Chemikalien, die Probenvorbereitung und die Konvertierung der Thiazolinon-Aminosäuren beschrieben.

3.4.1. Chemikalien

Die zur automatischen Sequenzierung verwendeten Chemikalien sind "sequenal grade" Chemikalien:

Phenylisothiocyanat (PITC)

Heptafluorbuttersäure (HFBA)

Quadrol-Puffer pH 9,0 (N,N,N',N'-tetrakis-(2-hydroxypropyl)-äthylendiamin-Trifluoressigsäure-Puffer in n-Propanol-Wasser)

DMBA-Puffer pH 9,4 (N,N-dimethylbenzylamin-Essigsäure-Puffer in n-Propanol-Wasser)

n-Heptan

Äthylacetat

Benzol

n-Butylchlorid

Äthylmercaptan

Zur Umlagerung in die PTH-Aminosäuren wird benötigt:

1,0 N Salzsäure, 0,1 % Äthylmercaptan enthaltend

Ascorbinsäure

Natriumhydroxyd

Zur Derivatisierung der Peptide wird benötigt:

N-äthyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC)

bidestilliertes Wasser, pH 4,0 eingestellt mit HCl

10 %ige Essigsäure

2-naphthylamin-1,5-disulfonsäure (ANS)

G 10 Sephadex

Zur Überprüfung der Sequenator-Funktionen und Erprobung der Programme werden Kontrollproteine mit bekannter Aminosäuresequenz verwendet:

Spermwahl-Myoglobin

Rinder-Insulin, A-Kette, oxydierte Form

Als Schutzgas und zum Einengen der Reaktionsprodukte wird Stickstoff, 99,995 % N₂, verwendet.

3.4.2. Durchführung eines Sequenzer-Laufes

Für die Sequenzierung eines Proteins werden mindestens 2 mg Material zur Erzielung eines gleichmäßigen Proteinfilms benötigt. Maximal können 10 mg aufgetragen werden. Eine größere Beladung des Reaktionsgefäßes mit Protein wirkt sich nachteilig auf die Stabilität des Proteinfilms und damit auf die Qualität der Sequenzierung aus. Es wird deshalb versucht, mit möglichst geringen Mengen auszukommen. Die maximale Menge wird nur zum Abbau großer Proteine über 50.000 dalton benötigt, um die zur Identifizierung der PTH-Aminosäuren erforderlichen Mindestmengen zu erhalten.

Disulfidbrücken im Protein blockieren den weiteren Edman-Abbau. Sie müssen deshalb reduziert und die freien SH-

Gruppen geschützt werden. Dies erfolgt am besten durch Mercaptolyse und Carboxymethylierung. Die Methoden hierzu werden in Kapitel 5 an Fibrinogen beschrieben.

Weiterhin muß darauf geachtet werden, daß das Protein sehr gut von Salzen aus Präparations- und Reinigungsmethoden befreit ist. Sie verringern die Reaktionsausbeute beträchtlich und fördern die Auswaschung. Besonders nachteilig auf den Reaktionsablauf wirken sich auch Spuren von Schwermetallionen aus. Da diese von den Vakuum-Sensoren des Sequenators während des Betriebs in Spuren abgedampft werden, sollte die Überprüfung des Vakuums möglichst selten mit diesen Sensoren während eines Sequenzer-Laufes erfolgen.

Das Protein wird in gelöster Form in das trockene, aufgeheizte und rotierende Reaktionsgefäß gebracht. Als Lösungsmittel eignen sich DMBA, HFBA, verdünnte Essig- oder Ameisensäurelösungen. In den meisten Fällen wird das Lösungsmittel des letzten Reinigungsschrittes verwendet.

Nach dem Auftragen wird das Protein wieder getrocknet durch schrittweise Druckverminderung. Daran schließt sich ein Programmzyklus ohne Kupplungsreagenz PITC, jedoch mit allen anderen Lösungsmitteln und Reagenzien an. Erst danach wird mit dem Abbau nach den in 3.5. beschriebenen Programmen begonnen.

Die abgespaltenen Thiazolinon-Aminosäuren werden in einem Fraktionensammler bei 4°C aufgefangen und unter einem leichten Stickstoffstrom bei einem Druck von 29 Torr eingeeengt.

3.4.3. Konvertierung der Thiazolinon-Derivate

Nach der Entnahme aus dem Fraktionensammler werden die Thiazolinon-Aminosäuren zunächst vollständig mit Stickstoff getrocknet. Dies geschieht mit einem N-Evaporator von Organomation Assoc., Worcester, Massachusetts.

Die Überführung in PTH-Aminosäuren kann dann in wässriger Phase wie von Edman beschrieben (29) oder durch

thermische Umlagerung nach Guyer und Todd (34) durchgeführt werden. Der Nachteil der Umlagerung in wässriger Phase liegt in der dabei gleichzeitig ablaufenden Hydrolyse von Asparagin und Glutamin zu Asparaginsäure und Glutaminsäure. Es wurde beobachtet, daß dies nicht nur in den von Edman angegebenen "wenigen Prozent" sondern bis zu 100 % erfolgen kann. Dies wird bei der thermischen Umlagerung ausgeschlossen. Der Vorteil der hydrolytischen Umlagerung liegt darin, daß bei der anschließenden Extraktion die PTH-Aminosäuren von den bei Gaschromatographie und Dünnschichtchromatographie störenden Nebenprodukten getrennt werden. PTH-Arginin, PTH-Histidin und PTH-Cysteinsäure, die gaschromatographisch nur schlecht beziehungsweise gar nicht nachweisbar sind, werden dabei ebenfalls von den übrigen PTH-Aminosäuren abgetrennt. Sie stehen dadurch isoliert in der wässrigen Phase für einen dünnschichtchromatographischen Nachweis zur Verfügung. Deshalb werden je nach den Erfordernissen beide Verfahren angewendet.

3.4.3.1. Hydrolytische Umlagerung

Die getrockneten Thiazolinon-Aminosäuren werden mit 0,2 ml 1 N HCl mit 0,1 % Äthylmercaptan aufgenommen und unter Stickstoffatmosphäre im Ölbad 10 min auf 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird zweimal mit je 0,7 ml Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetat-Phase wird unter Stickstoff eingedampft. Die wässrige Phase wird im Exsikkator über Natriumhydroxid getrocknet.

Das zur Extraktion verwendete Äthylacetat muß Peroxidfrei sein. Es wird deshalb vor Gebrauch mit Stickstoff gespült und dann über Ascorbinsäure aufbewahrt.

In der wässrigen Phase verbleiben PTH-Arginin, PTH-Cysteinsäure und PTH-Histidin.

Nach einer Derivatisierung von Peptiden mit β -Naphthylamindisulfonsäure nach Reaktionsgleichung 13 und 3.4.4. verbleiben auch Glutaminsäure und Asparaginsäure in der wässrigen Phase. Die bei dieser Reaktion entstehenden ANS-Derivate von Glutaminsäure und Asparaginsäure sind

als PTH-Derivate ebenfalls nicht mehr in Äthylacetat löslich.

4.3.2. Thermische Umlagerung:

Die getrockneten Thiazolinon-Derivate werden unter Stickstoffatmosphäre im Ölbad 30 min auf 80°C erhitzt.

4.4. Derivatisierung von Peptiden

Für Verringerung der Auswaschungsrate werden Peptide nach dem verfahren von Foster et al. (33) derivatisiert. Das Peptid wird hierzu in 400 µl bidestilliertem Wasser gelöst, das vorher mit 0,01 N HCl auf pH 4,0 eingestellt worden ist. Pro Äquivalent freier Carboxylgruppe werden zwei Äquivalente EDC und ANS zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 4 h bei Zimmertemperatur geschüttelt. Danach wird mit 400 µl 10 %iger Essigsäure verdünnt. Die Mischung kann sofort in das Reaktionsgefäß des Sequenators gefüllt werden. Bei einer Gesamteinwaage von über 10 mg ist es jedoch erforderlich das Peptid durch eine Gelfiltration an G 10 Sephadex in 10 %iger Essigsäure von nicht umgesetzten Chemikalien und Nebenprodukten zu reinigen.

5. Programmierung des Sequenators

Die ersten Sequenzierungsversuche wurden mit Quadrolpuffer pH 9,0 nach Edman (29) durchgeführt, und zwar mit einem Programm von Beckman Instruments Inc., Palo Alto, California, im Folgenden als Quadrolprogramm bezeichnet.

Die Umstellung auf das Puffersystem von Hermodson (35) hat sich jedoch als zweckmäßig erwiesen. Dabei wird DMBA-Puffer pH 9,4 verwendet.

Vorteile des DMBA-Puffersystems sind:

Es werden keine so hohen Anforderungen an das Vakuumsystem gestellt, da unter Stickstoffatmosphäre gear-

beitet wird.

2. Der Abbau läßt sich wesentlich weiter durchführen;
40 - 50 Aminosäuren lassen sich normalerweise gut nacheinander abspalten.

3. Proteine und Peptide lassen sich mit den gleichen Programmen abbauen. Kleine Peptide lassen sich durchgehend bis zur C-terminalen Aminosäure sequenzieren, wenn sie nach Reaktionsgleichung 13 derivatisiert werden.

4. Der Proteinfilm an der Wandung des Reaktionsgefäßes haftet bei verlängerten Trocknungszeiten (DMBA-Programm I) wesentlich fester als bei Verwendung des Quadrol-Puffers. Eine Proteinkontraktion, die zu Zusammenbruch und Ablösung des Proteinfilms und damit zu großen Materialverlusten führt, ist seither nicht mehr beobachtet worden.

Nachteilig ist:

1. Aus Reagenzien und Lösungsmitteln entstehen Kondensationsprodukte, die zum Ausfall des Vakuumsystems führen können. Durch Anwendung der in 3.3. entwickelten Reinigungsmethoden läßt sich jedoch ein guter Betriebszustand aufrecht erhalten.

2. Die bereits abgespaltenen Aminosäuren treten in den nachfolgenden Fraktionen mit einem höheren Anteil auf als bei Verwendung des Quadrol-Programms. Durch Entwicklung des DMBA-Programms II werden aber bessere Ergebnisse erzielt.

3. Zwei aufeinanderfolgende Cysteinsäuren lassen sich schlecht abbauen, die Ausbeute sinkt unter 50 % und die Overlaps erhöhen sich entsprechend. Eine Verbesserung bringt die Verwendung des DMBA-Programms III. Kopplungsreaktion und Abspaltung werden dabei bei jedem Abbau-schritt zweimal durchgeführt.

4. Eine Asparaginyll-Glycyl-Bindung läßt sich ebenfalls schwer spalten. Dies ist jedoch kein schwerwiegender Nachteil, denn diese Aminosäurekonstellation kommt selten in Proteinen vor. Diese Bindung kann zudem spezi-

Fisch durch Hydroxylamin (36) gespalten werden.

Programm: Quadrol

Programm mit doppelter Durchführung der Spaltungsreaktion.

Programmschritte: 75

Zeitbedarf: 1 h 28 min 6 sec

Reaktionstemperatur: 53°C

Fraktionensammler (FC): 4°C; Vakuum (Vac) + Stick-

stoff (N₂) = Trocknung (Dry)

Drehzahl des Reaktionsgefäßes (Speed): H = 1.500 U/min

L = 1.000 U/min

Reagenzien:

Druck (Torr):

R₁ = 5 % PITC in Heptan

110

R₂ = Quadrol

180

R₃ = HFBA

160

Lösungsmittel:

S₁ = Benzol

120

S₂ = Äthylacetat

120

S₃ = Butylchlorid,

120

0,1 % Äthylmercaptan

Step Funktion

sec Speed FC

1 Stop Program

2 L Dry

2 Cell Pressurize

6 L Dry

3 R₁, R₂ Vent

10 L Dry

4 R₁, R₂ Pressurize

30 L Dry

5 Delay

2 H Dry

6 R₁ Deliver, Effluent to Waste

7 H Dry

7 Restr. Vacuum

40 H Dry

8 Cell Pressurize

6 H Dry

9 N₂-Dry

20 H Dry

Step	Funktion	sec	Speed	FC
10	Delay	2	H	Dry
11	R ₂ Pressurize	4	H	Dry
12	R ₂ Deliver	33	H	Dry
13	Coupling Reaktion	10	H	Dry
14	Coupling Reaktion	10	L	Dry
15	Coupling Reaktion	10	H	Dry
16	Coupling Reaktion	10	L	Dry
17	Coupling Reaktion	100	H	Dry
18	Coupling Reaktion	200	L	Dry
19	Coupling Reaktion	200	H	Dry
20	Coupling Reaktion	200	L	Dry
21	S ₁ ,S ₂ Vent	30	H	Dry
22	S ₁ ,S ₂ Pressurize	30	H	Dry
23	S ₂ Deliver	4	H	Dry
24	Restr. Vacuum	160	H	Dry
25	Low Vacuum	10	H	
26	Delay	2	H	Dry
27	Cell Pressurize	6	H	Dry
28	S ₁ Deliver, Effluent to Waste	120	H	Dry
29	Delay, Effluent to Waste	2	H	Dry
30	Restr. Vacuum + S ₂ Vent	30	H	Dry
31	Restr. Vacuum + S ₂ Pressurize	30	H	Dry
32	Low Vacuum	20	H	
33	Delay	2	H	Dry
34	Cell Pressurize	100	H	Dry
35	S ₂ Deliver, Effluent to Waste	900	H	Dry
36	Delay, Effluent to Waste	40	H	Dry
37	Restr. Vacuum	260	H	Dry
38	Low Vacuum	120	H	
39	High Vacuum + N ₂ Flush	200	H	Dry
40	Delay	2	H	Dry
41	Cell Pressurize	6	H	Dry
42	R ₃ Vent	10	H	Dry
43	R ₃ Pressurize	10	H	Dry
44	R ₃ Deliver	14	H	Dry
45	1. Cleavage Reaktion	160	H	Dry
46	1. Cleavage Reaktion	20	L	Dry

Step	Funktion	sec	Speed	FC
47	Restr. Vacuum + S ₃ Vent	130	L	N ₂
48	High Vacuum + S ₃ Pressurize	40	L	Step
49	Delay	2	L	
50	Cell Pressurize	4	H	
51	S ₃ Deliver, Effluent to Collector	150	H	
52	Delay, Effluent to Collector	40	H	
53	Restr. Vacuum	160	H	Dry
54	Low Vacuum	200	H	
55	High Vacuum + N ₂ Flush	60	H	Dry
56	Delay	2	H	Dry
57	Cell Pressurize	6	H	Dry
58	R ₃ Vent	10	H	Dry
59	R ₃ Pressurize	10	H	Dry
60	R ₃ Deliver, Effluent to Waste	14	H	Dry
61	2. Cleavage Reaktion	100	H	Dry
62	2. Cleavage Reaktion	20	L	Dry
63	Restr. Vacuum	200	L	Dry
64	Low Vacuum + S ₃ Vent	30	L	
65	High Vacuum + N ₂ Flush + S ₃ Pressurize	40	L	Dry
66	Delay	2	L	Dry
67	Cell Pressurize	6	H	Dry
68	S ₃ Deliver, Effluent to Waste	150	H	Dry
69	Delay, Effluent to Waste	40	H	Dry
70	Restr. Vacuum	160	H	Dry
71	Low Vacuum	220	H	
72	High Vacuum + N ₂ Flush	300	L	Dry
73	Start Program	0	L	Dry
74	High Vacuum + N ₂ Flush, Last Cycle	980	L	Dry
75	High Vacuum, Conditional Stop		L	Vac

Programm: DMBA I

Programmschritte (Step): 48

Zeitbedarf: 2 h 0 min 53 sec

Reaktionstemperatur: 57°C

Fraktionensammler (FC): 4°C; Vakuum (Vac) + Stickstoff (N₂) = Trocknung (Dry)

Drehzahl des Reaktionsgefäßes (Speed): H = 1.500 U/min
L = 1.000 U/min

Reagenzien:

Druck (Torr):

R₁ = 5 % PITC in Heptan 110

R₂ = DMBA 180

R₃ = HFBA 160

Lösungsmittel:

S₁ = Benzol 120

S₂ = Benzol 120

S₃ = Butylchlorid, 120
0,1 % Äthylmercaptan

Step	Funktion	sec	Speed	FC
1	Stop Program	2	L	Dry
2	Cell Pressurize, R ₁ + R ₂ Vent	10	H	Dry
3	Delay	0	H	Dry
4	R ₁ +R ₂ Pressurize	10	H	Dry
5	Delay	0	H	Dry
6	R ₁ Deliver, Effluent to Waste	4	H	Dry
7	Restr. Vacuum	40	H	Dry
8	Cell Pressurize	4	H	Dry
9	N ₂ -Dry	20	H	Dry
10	R ₂ Deliver, Effluent to Waste	17	H	Dry
11	Coupling Reaktion	600	H	Dry
12	Coupling Reaktion	600	L	Dry
13	Restr. Vacuum	200	L	Dry
14	Low Vacuum	60	L	
15	High Vacuum + N ₂ Flush	260	L	Dry
16	High Vacuum + N ₂ Flush + S ₁ , S ₂ Vent	30	L	Dry
17	High Vacuum + N ₂ Flush + S ₁ , S ₂ Press.	30	L	Dry
18	Delay	0	L	Dry
19	Cell Pressurize	4	L	Dry
20	S ₂ Deliver, Effluent to Waste	20	L	Dry
21	Delay	60	L	Dry
22	S ₂ Deliver, Effluent to Waste	200	H	Dry
23	S ₁ Deliver, Effluent to Waste	200	H	Dry

Step	Funktion	sec	Speed	FC
24	N ₂ -Dry	60	H	Dry
25	Restr. Vacuum	200	H	Dry
26	Low Vacuum	200	H	
27	High Vacuum + N ₂ Flush	600	H	Dry
28	High Vacuum + N ₂ Flush + R ₃ ,S ₃ Vent	20	H	Dry
29	High Vacuum + N ₂ Flush + R ₃ ,S ₃ Press.	20	H	Dry
30	Delay	0	H	Dry
31	Cell Pressurize	4	H	Dry
32	R ₃ Deliver, Effluent to Waste	14	H	Dry
33	Cleavage Reaktion	120	H	Dry
34	Cleavage Reaktion	60	L	Dry
35	Low Vacuum	100	L	
36	High Vacuum + N ₂ Flush	70	L	N ₂
37	High Vacuum + N ₂ Flush	30	L	Step
38	Delay	0	L	
39	Cell Pressurize	4	H	
40	S ₃ Deliver, Effluent to Collector	150	H	
41	Cell Pressurize, Effluent to Collect.	30	H	
42	Restr. Vacuum	800	H	Dry
43	Low Vacuum	800	H	
44	High Vacuum + N ₂ Flush	800	H	Dry
45	High Vacuum + N ₂ Flush	800	L	Dry
46	Start Program	0	L	Dry
47	High Vacuum + N ₂ Flush, Last Cycle	900	L	Dry
48	High Vacuum, Conditional Stop		L	Vac

Programm: DMBA II

Programm mit doppelter Durchführung der Spaltungsreaktion.

Programmschritte: 66

Zeitbedarf: 1 h 54 min 24 sec

Reaktionstemperatur: 57°C

Fraktionensammler (FC): 4°C; Vakuum (Vac) + Stickstoff (N₂) = Trocknung (Dry)

Drehzahl des Reaktionsgefäßes (Speed): H = 1.500 U/min
L = 1.000 U/min

Reagenzien:

Druck (Torr):

R_1 = 5 % PTC in Heptan	110
R_2 = DMBA	180
R_3 = HFBA	160

Lösungsmittel:

S_1 = Benzol	120
S_2 = Benzol	120
S_3 = Butylchlorid, 0,1 % Äthylmercaptan	120

Step	Funktion	sec	Speed	FC
1	Stop Program	2	L	Dry
2	Cell Pressurize + R_1, R_2 Vent	10	H	Dry
3	Delay	0	H	Dry
4	R_1, R_2 Pressurize	10	H	Dry
5	Delay	0	H	Dry
6	R_1 Deliver, Effluent to Waste	4	H	Dry
7	Restr. Vacuum	40	H	Dry
8	Cell Pressurize	4	H	Dry
9	N_2 -Dry	20	H	Dry
10	R_2 Deliver, Effluent to Waste	16	H	Dry
11	Coupling Reaktion	600	H	Dry
12	Coupling Reaktion	600	L	Dry
13	Restr. Vacuum	200	L	Dry
14	Low Vacuum	60	L	
15	High Vacuum + N_2 Flush	260	L	Dry
16	High Vacuum + N_2 Flush + S_1, S_2 Vent	30	L	Dry
17	High Vacuum + N_2 Flush + S_1, S_2 Press.	30	L	Dry
18	Delay	0	L	Dry
19	Cell Pressurize	4	L	Dry
20	S_2 Deliver, Effluent to Waste	20	L	Dry
21	Delay	60	L	Dry
22	S_2 Deliver, Effluent to Waste	200	H	Dry
23	S_1 Deliver, Effluent to Waste	200	H	Dry
24	N_2 -Dry	60	H	Dry
25	Restr. Vacuum	200	H	Dry
26	Low Vacuum	200	H	

Step	Funktion	sec	Speed	FC
27	High Vacuum + N ₂ Flush	600	H	Dry
28	High Vacuum + N ₂ Flush + R ₃ ,S ₃ Vent	20	H	Dry
29	High Vacuum + N ₂ Flush + R ₃ ,S ₃ Press.	20	H	Dry
30	Delay	0	H	Dry
31	Cell Pressurize	4	H	Dry
32	R ₃ Deliver, Effluent to Waste	14	H	Dry
33	1. Cleavage Reaktion	120	H	Dry
34	1. Cleavage Reaktion	60	L	Dry
35	Low Vacuum	100	L	
36	High Vacuum + N ₂ Flush	70	L	N ₂
37	High Vacuum + N ₂ Flush	30	L	Step
38	Delay	0	L	
39	Cell Pressurize	4	H	
40	S ₃ Deliver, Effluent to Collector	150	H	
41	Cell Pressurize, Effluent to Coll.	30	H	
42	N ₂ -Dry, Effluent to Waste	200	H	Dry
43	Restr. Vacuum	200	H	Dry
44	Low Vacuum	60	H	
45	High Vacuum + N ₂ Flush	260	H	Dry
46	High Vacuum + N ₂ Flush + R ₃ ,S ₃ Vent	20	H	Dry
47	High Vacuum + N ₂ Flush + R ₃ ,S ₃ Press.	20	H	Dry
48	Delay	0	H	Dry
49	Cell Pressurize	4	H	Dry
50	R ₃ Deliver, Effluent to Waste	14	H	Dry
51	2. Cleavage Reaktion	120	H	Dry
52	2. Cleavage Reaktion	60	L	Dry
53	Low Vacuum	100	L	
54	High Vacuum + N ₂ Flush	70	L	N ₂
55	High Vacuum + N ₂ Flush	30	L	
56	Delay	0	L	
57	Cell Pressurize	4	H	
58	S ₃ Deliver, Effluent to Collector	120	H	
59	Cell Pressurize, Effluent to Coll.	30	H	
60	N ₂ -Dry, Effluent to Waste	200	H	Dry
61	Restr. Vacuum	200	H	Dry
62	Low Vacuum	200	H	
63	High Vacuum + N ₂ Flush	900	H	Dry

Step Funktion	sec	Speed	FC
64 Start Program	0	L	Dry
65 High Vacuum + N ₂ Flush, Last Cycle	900	L	Dry
66 High Vacuum, Conditional Stop		L	Vac

Programm: DMBA III

Programm mit doppelter Durchführung der Kopplungsreaktion und der Spaltungsreaktion.

Programmschritte: 92

Zeitbedarf: 2 h 52 min 34 sec

Reaktionstemperatur: 57°C

Fraktionensammler (FC): 4°C; Vakuum (Vac) + Stickstoff (N₂) = Trocknung (Dry)

Drehzahl des Reaktionsgefäßes (Speed): H = 1.500 U/min
L = 1.000 U/min

Reagenzien:

Druck (Torr):

R₁ = 5 %PITC in Heptan

110

R₂ = DMBA

180

R₃ = HFBA

160

Lösungsmittel:

S₁ = Benzol

120

S₂ = Benzol

120

S₃ = Butylchlorid,

120

0,1 % Äthylmercaptan

Step Funktion

sec Speed FC

1 Stop Program	2	L	Dry
2 Cell Pressurize + R ₁ , R ₂ vent	10	H	Dry
3 Delay	0	H	Dry
4 R ₁ , R ₂ Pressurize	10	H	Dry
5 Delay	0	H	Dry
6 R ₁ Deliver, Effluent to Waste	4	H	Dry
7 Restr. Vacuum	40	H	Dry
8 Cell Pressurize	4	H	Dry
9 N ₂ -Dry	20	H	Dry

Step	Funktion	sec	Speed	FC
10	R ₂ Deliver, Effluent to Waste	17	H	Dry
11	1. Coupling Reaktion	600	H	Dry
12	1. Coupling Reaktion	600	L	Dry
13	Restr. Vacuum	200	L	Dry
14	Low Vacuum	60	L	
15	High Vacuum + N ₂ Flush	260	L	Dry
16	High Vacuum + N ₂ Flush + S ₁ , S ₂ Vent	30	L	Dry
17	High Vacuum + N ₂ Flush + S ₁ , S ₂ Press.	30	L	Dry
18	Delay	0	L	Dry
19	Cell Pressurize	4	L	Dry
20	S ₂ Deliver, Effluent to Waste	20	L	Dry
21	Delay	60	L	Dry
22	S ₂ Deliver, Effluent to Waste	200	H	Dry
23	S ₁ Deliver, Effluent to Waste	200	H	Dry
24	N ₂ -Dry	60	H	Dry
25	Restr. Vacuum	200	H	Dry
26	Low Vacuum	200	H	
27	High Vacuum + N ₂ Flush	600	H	Dry
28	High Vacuum + N ₂ Flush + R ₁ , R ₂ Vent	10	H	Dry
29	High Vacuum + N ₂ Flush + R ₁ , R ₂ Press.	10	H	Dry
30	Delay	0	H	Dry
31	Cell Pressurize	4	H	Dry
32	R ₁ Deliver	4	H	Dry
33	Restr. Vacuum	40	H	Dry
34	Cell Pressurize	4	H	Dry
35	N ₂ -Dry	20	H	Dry
36	R ₂ Deliver	17	H	Dry
37	2. Coupling Reaktion	600	H	Dry
38	2. Coupling Reaktion	600	L	Dry
39	Restr. Vacuum	200	L	Dry
40	Low Vacuum	60	L	
41	High Vacuum + N ₂ Flush	260	L	Dry
42	High Vacuum + N ₂ Flush + S ₁ , S ₂ Vent	30	L	Dry
43	High Vacuum + N ₂ Flush + S ₁ , S ₂ Press.	30	L	Dry
44	Delay	0	L	Dry
45	Cell Pressurize	4	L	Dry
46	S ₂ Deliver	20	L	Dry

Step	Funktion	sec	Speed	FC
47	Delay	60	L	Dry
48	S ₂ Deliver	200	H	Dry
49	S ₁ Deliver	200	H	Dry
50	N ₂ -Dry	60	H	Dry
51	Restr. Vacuum	200	H	Dry
52	Low Vacuum	200	H	
53	High Vacuum + N ₂ Flush	600	H	Dry
54	High Vacuum + N ₂ Flush + R ₃ , S ₃ Vent	20	H	Dry
55	High Vacuum + N ₂ Flush + R ₃ , S ₃ Press.	20	H	Dry
56	Delay	0	H	Dry
57	Cell Pressurize	4	H	Dry
58	R ₃ Deliver	14	H	Dry
59	1. Cleavage Reaktion	120	H	Dry
60	1. Cleavage Reaktion	60	L	Dry
61	Low Vacuum	100	L	
62	High Vacuum + N ₂ Flush	70	L	N ₂
63	High Vacuum + N ₂ Flush	30	L	Step
64	Delay	0	L	
65	Cell Pressurize	4	H	
66	S ₃ Deliver, Effluent to Collector	150	H	
67	Cell Pressurize, Effluent to Coll.	30	H	
68	N ₂ -Dry, Effluent to Waste	200	H	Dry
69	Restr. Vacuum	200	H	Dry
70	Low Vacuum	60	H	
71	High Vacuum + N ₂ Flush	260	H	Dry
72	High Vacuum + N ₂ Flush + R ₃ , S ₃ Vent	20	H	Dry
73	High Vacuum + N ₂ Flush + R ₃ , S ₃ Press.	20	H	Dry
74	Delay	0	H	Dry
75	Cell Pressurize	4	H	Dry
76	R ₃ Deliver, Effluent to waste	14	H	Dry
77	2. Cleavage Reaktion	120	H	Dry
78	2. Cleavage Reaktion	60	L	Dry
79	Low Vacuum	100	L	
80	High Vacuum + N ₂ Flush	70	L	N ₂
81	High Vacuum + N ₂ Flush	30	L	
82	Delay	0	L	
83	Cell Pressurize	4	H	

Step	Funktion	sec	Speed	FC
84	S ₃ Deliver, Effluent to Collector	120	H	
85	Cell Pressurize, Effluent to Coll.	30	H	
86	N ₂ -Dry, Effluent to Waste	200	H	Dry
87	Restr. Vacuum	200	H	Dry
88	Low Vacuum	200	H	
89	High Vacuum + N ₂ Flush	900	H	Dry
90	Start Program	0	L	Dry
91	High Vacuum + N ₂ Flush, Last Cycle	900	L	Dry
92	High Vacuum, Conditional stop		L	Vac

3.6. Ergebnisse und Diskussion

Mit den oben beschriebenen Programmen und Methoden sind die in den Kapiteln 5 und 6 aufgeführten Proteine und Peptide sequenziert worden. Dabei hat sich das DMBA-Programm II mit doppelter Abspaltung der Thiazolinon-aminosäuren durch HFBA am besten bewährt. Die Overlaps bleiben dabei relativ gering. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 10 Ausbeuten und Overlaps in Relation zum fortschreitenden Abbau gesetzt. Es kann die Sequenz von 40 - 45 Aminosäuren im allgemeinen gut bestimmt werden. Für die danach folgenden 10 bis 15 Aminosäuren sind noch sichere Aussagen über die zu erwartende Sequenz möglich. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber der Verwendung des herkömmlichen Quadrol-Puffersystems. Mit ihm konnten nur Sequenzen von 20 - 25 Aminosäuren aufgeklärt werden. Ein weitergehender Abbau ist nur mit aufwendigen technischen Investitionen möglich (37), da vor allem an das Vakuum-system wesentlich höhere Anforderungen gestellt werden müssen. Quadrol ist außerdem zum Abbau von Peptiden einer tryptischen oder chymotryptischen Spaltung sehr schlecht geeignet, da die Auswaschungsrate hoch ist. Um diese sequenzieren zu können wäre die Verwendung eines weiteren Puffersystems erforderlich gewesen. Die Verwendung von DMBA-Puffer macht dies überflüssig. Proteine und Pepti-

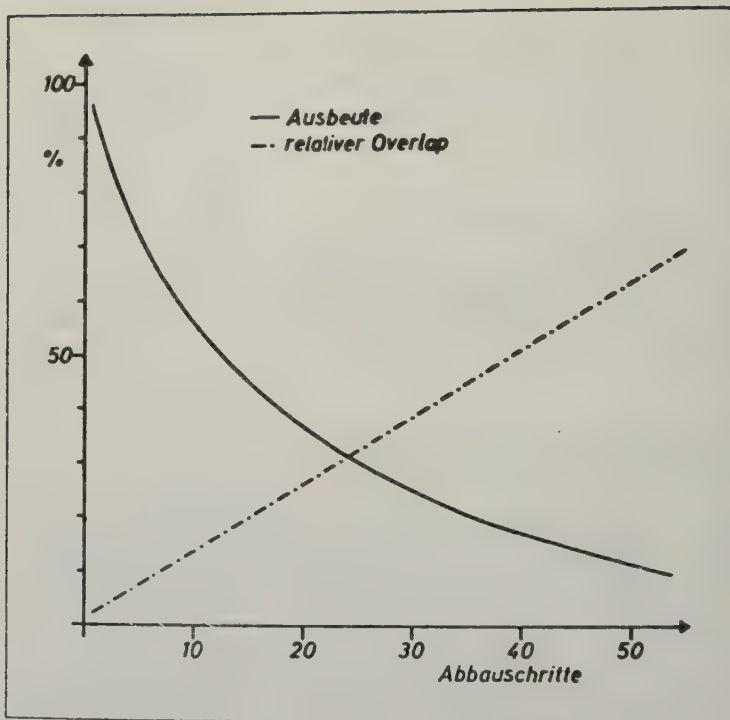


Abb. 10: Die bei einem typischen DMBA-Abbau erzielten Ausbeuten von PTH-Aminosäuren in den einzelnen Fraktionen und die dazu relativen Overlaps in der darauffolgenden Fraktion

de werden gleichermaßen gut sequenziert. Durch Derivatisierung von Peptiden nach 3.4.4. in einer einfachen Reaktion ist es auch möglich geworden, diese bis zum C-terminalen Ende zu sequenzieren.

Nachdem die zunächst aufgetretenen und in 3.3. beschriebenen technischen Schwierigkeiten überwunden sind, werden alle Sequenzierungen nur noch mit den drei DMBA-Programmen durchgeführt. Dabei dient Programm DMBA I hauptsächlich zur Sequenzierung großer Proteine über

10.000 dalton, wobei durch längere Trocknungszeiten eine Kontraktion des Proteinfilms verhindert wird. Programm DMBA II hält Overlaps verhältnismäßig niedrig und wird fast ausschließlich für die meisten Sequenzierungen verwendet. Programm DMBA III wird nur in besonderen Fällen benötigt, wenn etwa zwei Cysteinsäuren aufeinander folgen, oder wenn über eine Asparaginyll-Glycyl-Bindung weiter hinweg sequenziert werden soll. Dies ist erforderlich, um eine gute Überlappung der Peptide bei einer späteren Spaltung an dieser Bindung zu erhalten.

Die Derivatisierung der Peptide bis 4.000 dalton nach Reaktionsgleichung 13 wird der ebenfalls möglichen Kuppelung an eine Polystyrolmatrix vorgezogen, weil dazu ebenfalls ein spezielles Puffer- und Lösungsmittelsystem erforderlich wäre. Dies würde bei jeder Programmumstellung ein zeitraubendes und umständliches Reinigungsverfahren erfordern. So sind praktisch alle anfallenden Probleme mit einem Programm und den gleichen Lösungsmitteln und Reagenzien zu lösen und deshalb mit einem Minimum an Arbeitsaufwand und Material. Da bei der Derivatisierung von Peptiden auch Glutaminsäure und Asparaginsäure reagieren, ist eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit zu Glutamin und Asparagin gegeben. Die derivatisierten Aminosäuren lassen sich nach der Konvertierung zu PTH-Aminosäuren in wässriger Phase nicht mehr durch Äthylacetat extrahieren und verbleiben im Gegensatz zu Asparagin und Glutamin in der wässrigen Phase.

4. Identifizierung von Phenylthiohydantoin-Aminosäuren

4.1. Nachweismöglichkeiten

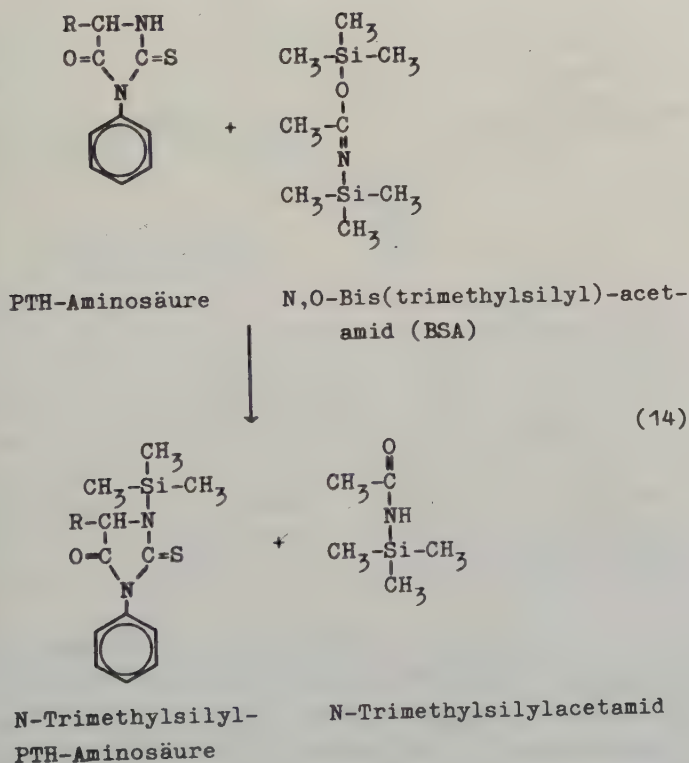
Eine wesentliche Aufgabe bei der Sequenzierung besteht in der Identifizierung der abgespaltenen Aminosäuren und der Zuordnung zu ihren Positionen in der Peptidkette. Bei der Identifizierung der PTH-Aminosäuren ist eine Unterscheidung der Derivate der zwanzig in der Natur vorkommenden Aminosäuren notwendig. Außerdem ist eine quantitative Bestimmung erforderlich, da bei fortschreitendem Abbau nicht mehr der Idealvorstellung von einer einzigen Aminosäure pro Abbauschritt entsprochen wird. Dies beruht auf der Zunahme der Overlaps und der Abnahme der Ausbeuten (s. Abb. 10) bei fortschreitender Sequenzierung und erfordert eine quantitative Interpretation der Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Fraktionen. Zur qualitativen und quantitativen Analyse der Zusammensetzung eines PTH-Aminosäuren-Gemisches lassen sich folgende Methoden anwenden:

1. Dünnschichtchromatographie
2. Gaschromatographie
3. Hochdruckflüssigkeitschromatographie
4. Quantitative Aminosäureanalyse
5. Massenspektrometrie

Die Dünnschichtchromatographie ist zweifellos die schnellste Nachweismethode. Durch Verwendung verschiedener Lösungsmittelsysteme nacheinander oder durch zweidimensionale Chromatographie lassen sich alle PTH-Aminosäuren voneinander trennen und nachweisen (38 - 40). Dabei ist es möglich, auch mehrere Fraktionen gleichzeitig zu untersuchen. Von Nachteil ist, daß quantitative Aussagen schwierig zu erhalten sind. Es ist im allgemeinen nur eine grobe Abschätzung der Konzentration möglich. Bei zunehmenden Overlaps ist deshalb schon sehr bald keine Aussage mehr über die als Hauptbestandteil vorkommende

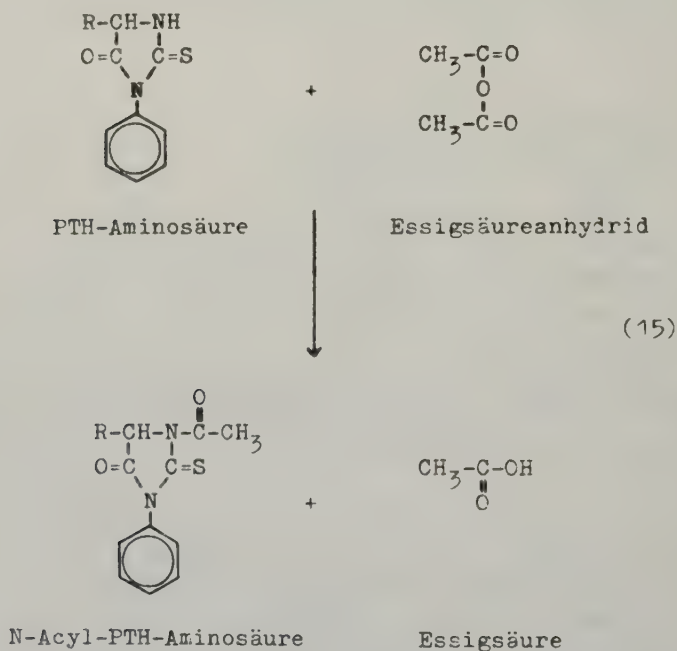
minosäure zu machen.

essentlich geeigneter ist deshalb die Gaschromatographie: Neben der Trennung ist eine quantitative Bestimmung möglich. Die PTH-Derivate einiger Aminosäuren sind jedoch nicht flüchtig und können erst nach einer weiteren Derivatisierung nachgewiesen werden. Dies kann zum Beispiel durch Silylierung mit N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamid (BSA) erfolgen (41) nach dem Reaktionsmechanismus:



Eine weitere Möglichkeit, flüchtige PTH-Aminosäuren zu erhalten, besteht in der N-Acylierung (42) nach der Reaktionsgleichung 15. Nicht alle nachweisbaren PTH-Aminosäuren beziehungsweise ihre Derivate sind zudem mit dem gleichen Verteilungssystem zu trennen. Es sind im-

mer. mehrere Analysen an verschiedenen Trennsäulen bei unterschiedlichen Temperaturprogrammen erforderlich. Dadurch wird die für eine umfassende Analyse erforderliche Arbeitszeit enorm verlängert und der Bedarf an Analysensubstanz steigt beträchtlich. Die Antwortsignale der basischen Aminosäuren sind zudem nicht immer zufriedenstellend.



Die Vorteile von Gas- und Dünnschichtchromatographie vereinigt die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Auch dabei sind zumindest zwei Trennsysteme erforderlich (43, 44). Es lassen sich jedoch die Thiazolinonderivate der Aminosäuren direkt ohne vorherige Umlagerung und weitere Derivatisierung analysieren. Der apparative Aufwand ist allerdings wesentlich größer als bei den zuerst genannten Verfahren. Eine exakte quantitative Trennung liefert auch die

Aminosäureanalyse mit automatischen Aminosäureanalysatoren. Hierzu müssen die PTH-Aminosäuren hydrolysiert werden (45). Es ist deshalb ein zeitraubendes und umständliches Verfahren und bietet sich nur zu nachträglicher Kontrolle nach einer vorangegangenen Gas- oder Dünnschichtchromatographie an. Erstrebenswert ist beim automatischen Edman-Abbau ein rasch greifbares und zuverlässiges Ergebnis, damit über die Fortführung eines Abbaus möglichst frühzeitig entschieden werden kann. Die Vorteile aller Verfahren vereinigt die Massenspektroskopie (46). Mit ihrer Hilfe ist jede Aminosäure quantitativ in einem einzigen Analysengang zu erfassen. Eine Überführung in die PTH-Derivate erübrigt sich ausserdem, da der Nachweis bereits mit den Thiazolinonderivaten geführt werden kann.

4.2. Aufgabenstellung

Es sind die apparativen Voraussetzungen für die analytischen Methoden Dünnschichtchromatographie und Gaschromatographie gegeben. Unter optimaler Ausnutzung dieser Möglichkeiten sollen die beim Edman-Abbau anfallenden PTH-Aminosäuren mit möglichst zeitsparenden und empfindlichen Methoden voneinander getrennt und quantitativ bestimmt werden. Erforderliche Derivatisierungen sollen möglichst einfach durchführbar sein.

4.3. Gaschromatographie

In der Hauptsache kommt bei der Identifizierung der PTH-Aminosäuren und ihrer Derivate ein gaschromatographischer Nachweis zur Anwendung. Um alle PTH-Aminosäuren qualitativ und quantitativ nachweisen zu können sind zwei Trennsysteme mit insgesamt vier Temperaturprogrammen und zwei Derivatisierungsmethoden erforderlich.

4.3.1. Gaschromatograph

Für die Analysen wird ein Doppelsäulen-Gaschromatograph Modell 5710 A von Hewlett-Packard Comp., Palo Alto, California, verwendet. Das Gerät ist mit temperaturregelbarem Doppelflammenionisationsdetektor und Einspritzblock und einem linearen Ofentemperaturprogrammer mit automatischer Abkühlung versehen. Der Detektor erlaubt wahlweise Einkanalbetrieb getrennt für beide Säulen oder eine Kompensationsschaltung. Die Registrierung erfolgt mit einem Einkanalschreiber Modell 7123 B der gleichen Firma.

Die zum Betrieb des Gaschromatographen erforderlichen Gase haben eine Reinheit von 99,995 %. Es sind dies für den Detektor Wasserstoff und synthetische Luft und als Trägergas Helium. Die Durchflußmengen sind für alle Programme und Säulen gleich und für die einzelnen Gase wie folgt eingestellt:

Wasserstoff = 60 ml/min

synthetische Luft = 240 ml/min

Helium = 50 ml/min

4.3.2. Trennsäulen

An eine gute Trennsäule werden folgende Anforderungen gestellt:

1. geringe Analysenzeit
2. optimale Trennleistung
3. hohe Belastbarkeit
4. große Empfindlichkeit

Im Fall der PTH-Aminosäuren würde dies bedeuten, daß eine rasche Trennung aller zwanzig Derivate mit möglichst wenig Analysensubstanz bei einer einzigen Analyse wünschenswert ist. Es sind jedoch nicht alle Derivate am gleichen System aufzutrennen; zudem sind nicht alle gleichermaßen flüchtig, sodaß eine weitere Derivatisierung in einigen Fällen erforderlich ist.

Für die Trennung wurde deshalb zunächst das von Bober (47) beschriebene System ausgewählt, das eine

inwandfreie Unterscheidung; und quantitative Auswertung von Leucin und Isoleucin ermöglicht. Gegenüber verschiedenen anderen PTH-Aminosäuren zeigt diese Säure jedoch nicht so gute Trenneigenschaften. Es war deshalb zur Überwindung dieser Probleme erforderlich, verschiedene Temperaturprogramme und eine weitere Säure zu entwickeln, die im gleichen Temperaturintervall verwendet werden kann. Außerdem sollten die Produkte weiterer erforderlicher Derivatisierungsmethoden am gleichen System analysiert werden.

4.3.2.1. Materialien

Silicone GE SE 30 (Methylsilicongummivorprodukt)

Silicone DC QF-1 (Fluoralkylsilicongummi)

Silicone DC 560 (Chlorphenylmethylsiliconöl)

Chromosorb HP WAW-DMCS, 100 - 120 mesh

Dimethyldichlorosilan

Toluol

konz. Salzsäure

Methanol, getrocknet

Aceton

Chloroform

Silysil-8 GLC Column Conditioner

Freon 113

Silanisierte Glaswolle

Stickstoff, 99,995 % N₂

Stabile GC-Septa

Graphite-Ferrules

4.3.2.2. Abmessungen und Zusammensetzung der Trennsäulen

Es werden zwei Glas-Säulen mit silanisierter Oberfläche von 90 cm Länge und 2 mm innerem Durchmesser verwendet.

Die stationäre Phase hat die Zusammensetzung in

Säule A: 4,25 % Silicone DC QF-1 und 0,75 % Silicone GE

SE 30 auf Chromosorb HP WAW-DMCS, 100 - 120 mesh

und in

Säule B: 5 % Silicone DC 560, 2,1 % Silicone DC QF-1

und 0,4 % Silicone GE SE 30 auf Chromosorb HP WAW-

DMCS, 100 - 120 mesh

4.3.2.3. Belegung der stationären Phase

Das Trägermaterial wird mit der Trennflüssigkeit wie folgt (48) belegt:

Eine Stieltfritte G 4 wird beheizt und mit Stickstoff vom Stiel her durchgespült. In diese Fritte wird eine abgewogene Menge Trägermaterial (Chromosorb HP W-AW-DMCS) gefüllt. Die dafür berechnete Menge flüssiger Phase wird in Aceton-Chloroform (1:1) vollständig gelöst, auf das Trägermaterial aufgeschüttet und leicht verrührt. Die Heiztemperatur wird dann so bemessen, daß das Lösungsmittel in etwa 10 min vollständig verflüchtigt ist. Anschließend wird bei einer etwa 20°C höheren Temperatur noch eine weitere Stunde im Stickstoffstrom getrocknet.

4.3.2.4. Füllung und Konditionierung der Säulen

Die Oberfläche der Glasrohre wird zunächst durch Silanisieren inaktiviert. Zu diesem Zweck werden die Säulen mit konzentrierter Salzsäure gereinigt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Dann werden die Säulen mit Aceton gespült und bei 140°C getrocknet. Sie werden danach 10 min mit 5 % Dichlordimethylsilan in Toluol behandelt. Anschließend wird mit trockenem Methanol, dann mit Aceton gespült und wiederum bei 140°C getrocknet. Dann kann die stationäre Phase eingefüllt werden. Dies muß vorsichtig erfolgen, damit ein Abrieb oder Bruch der Körner des Trägermaterials weitgehend verhindert wird. Durch leichtes Klopfen an die Rohrwandung und Anlegen von Wasserstrahl-Vakuum wird die Packung verdichtet. Das am Einspritzblock anzuschließende Säulenende wird auf 2 cm Länge mit silanisierter Glaswolle gefüllt. Diese ist während des Betriebs von Zeit zu Zeit zu erneuern.

Die gepackten Säulen müssen nun konditioniert werden. Hierzu werden sie zunächst für eine Stunde ohne Trägergasdurchfluß auf 300°C aufgeheizt und anschließend wieder rasch auf Raumtemperatur abgekühlt. Dann wird bei einem Trägergasfluß von 15 ml/min mit einer Heizrate von 2°C/min auf 220°C aufgeheizt. Diese Temperatur

wird etwa 24 Stunden beibehalten. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Trägergasdurchfluß auf 50 ml/min eingestellt und mit einer Heizrate von 2°C/min auf 250°C aufgeheizt. Bei dieser Temperatur werden die Säulen noch einmal zehn Stunden ausgeheizt. Zur Nachbehandlung wird dann im Arbeitstemperaturbereich (175 - 250°C) einigemal Silyl-8 zur Inaktivierung eventuell noch vorhandener aktiver Zentren eingespritzt. Letzteres wird auch während des Betriebs von Zeit zu Zeit vorgenommen. Es unterdrückt das mit der Zeit auftretende "Tailing" der Peaks und verlängert so die Lebensdauer der Säulen.

Beim Anschluß der Säulen im Gaschromatographen hat sich die Verwendung von Graphit-Ferrules zur Abdichtung sehr gut bewährt. Die Analysenproben werden durch Stabiline-GC-Septa eingespritzt, die nur geringes Ausbluten zeigen und sehr widerstandsfähig sind.

Das im Detektor sich niederschlagende SiO₂ von silylierten Analysenproben wird durch gelegentliches Einspritzen von Freon 113 beseitigt.

4.3.3. Analysenprogramme

Beide Trennsäulen haben eine maximale Arbeitstemperatur von 250°C und lassen sich deshalb im gleichen Gaschromatographen nebeneinander verwenden. Die Temperaturbedingungen sind für den Einspritzblock und den Detektor bei allen Programmen gleich und zwar

Einspritzblock = 350°C

Detektor = 300°C

Der Ofen wird nach den folgenden Programmen beheizt, die so ausgelegt sind, daß für jede PTH-Aminosäure mindestens einmal eine quantitative Bestimmung möglich ist.

Programm I für Säule A ist das Grundprogramm, mit dem 12 PTH-Aminosäuren isoliert und bestimmt werden können. Es sind dies die PTH-Derivate von

Alanin	Leucin	Phenylalanin
Asparagin	Lysin	Threonin
Glutamin	Prolin	Tryptophan
Isoleucin	Methionin	Tyrosin

Der Ofen wird nach dem Einspritzen der Analysenprobe 8 min bei der Anfangstemperatur von 175°C belassen, dann mit 16°C/min auf eine Endtemperatur von 250°C

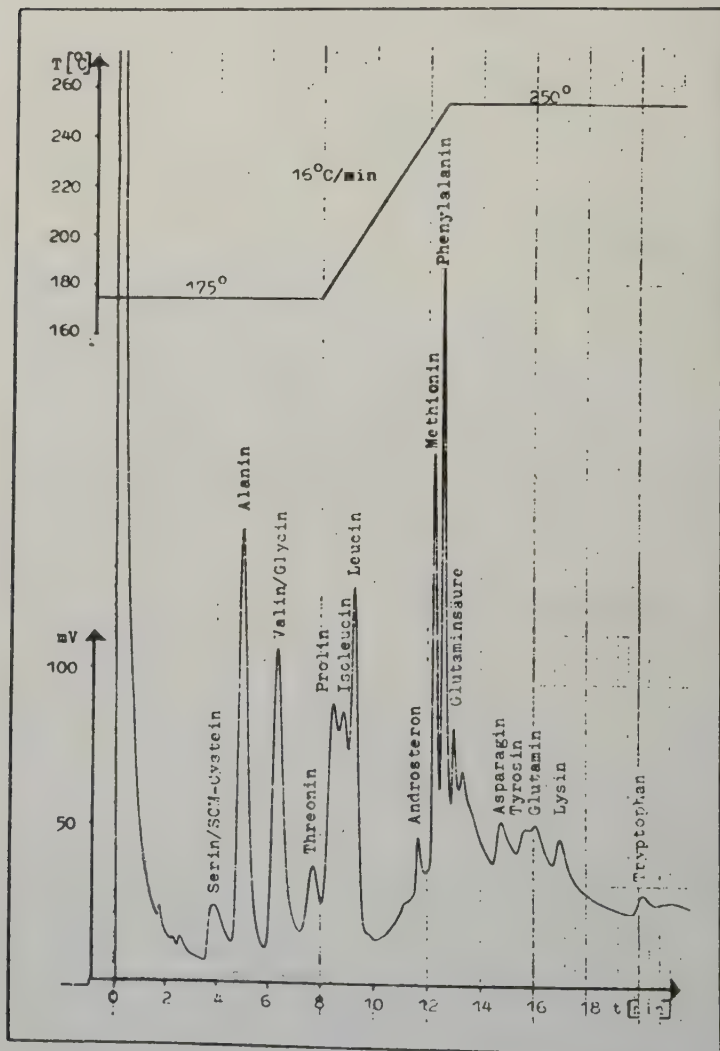


Abb. 11: Chromatogramm von je 10 nmol Standard-PTH-Aminosäuren; Programm I, Säule A

aufgeheizt. Abbildung 11 zeigt das Chromatogramm, das mit Standard-PTH-Aminosäuren von Pierce Chemical Comp., Rockford, Illinois, erhalten wird. Als interner Standard kann Androsteron verwendet werden. Pro Aminosäure werden jeweils 10 nmol eingespritzt. PTH-Valin und PTH-Glycin haben die gleiche Retentionszeit, ebenso PTH-Serin und PTH-S-Carboxymethylcystein. Von den PTH-Aminosäuren Arginin, Histidin, Cysteinsäure und Asparaginsäure erhält man keine Peaks. Der PTH-Glutaminsäure-Peak ist nicht reproduzierbar und kann deshalb nur als Anhaltspunkt für das Vorhandensein dieser PTH-Aminosäure verwertet werden. Die Analysenzeit beträgt 22 Minuten.

Programm II für Säule B ist das Programm für die TMS-Derivate der PTH-Aminosäuren. Aus Abbildung 12 ist zu ersehen, daß 16 PTH-Aminosäuren getrennt und bestimmt werden können. Es wird jedoch speziell zum Nachweis der PTH-Derivate von

Asparaginsäure
Glutaminsäure

SCM-Cystein
Serin

verwendet, die mit Programm I nicht quantitativ bestimmt werden können. Das Programm hat eine Anfangstemperatur von 210°C. Nach 8 min wird mit einer Heizrate von 8°C/min auf eine Endtemperatur von 250°C aufgeheizt. Die Analysenzeit beträgt 20 min. Für Abbildung 12 sind Standard-PTH-Aminosäuren silyliert worden. Die eingespritzte Menge beträgt jeweils 10 nmol.

PTH-Valin und PTH-Glycin ergeben mit diesem Programm ebenfalls zwei getrennte Peaks. Die Trennung ist jedoch auch ohne vorherige Derivatisierung an Säule B möglich:

Programm III für Säule B ist ein isothermes Programm mit einer Ofentemperatur von 170°C. Es wird verwendet, wenn die quantitative Bestimmung der PTH-Aminosäuren

Glycin
Valin

erforderlich ist. Abbildung 13 veranschaulicht die Trennung. Sie zeigt ein Chromatogramm von je 10 nmol PTH-Alanin, PTH-Glycin, PTH-Valin und PTH-Threonin,

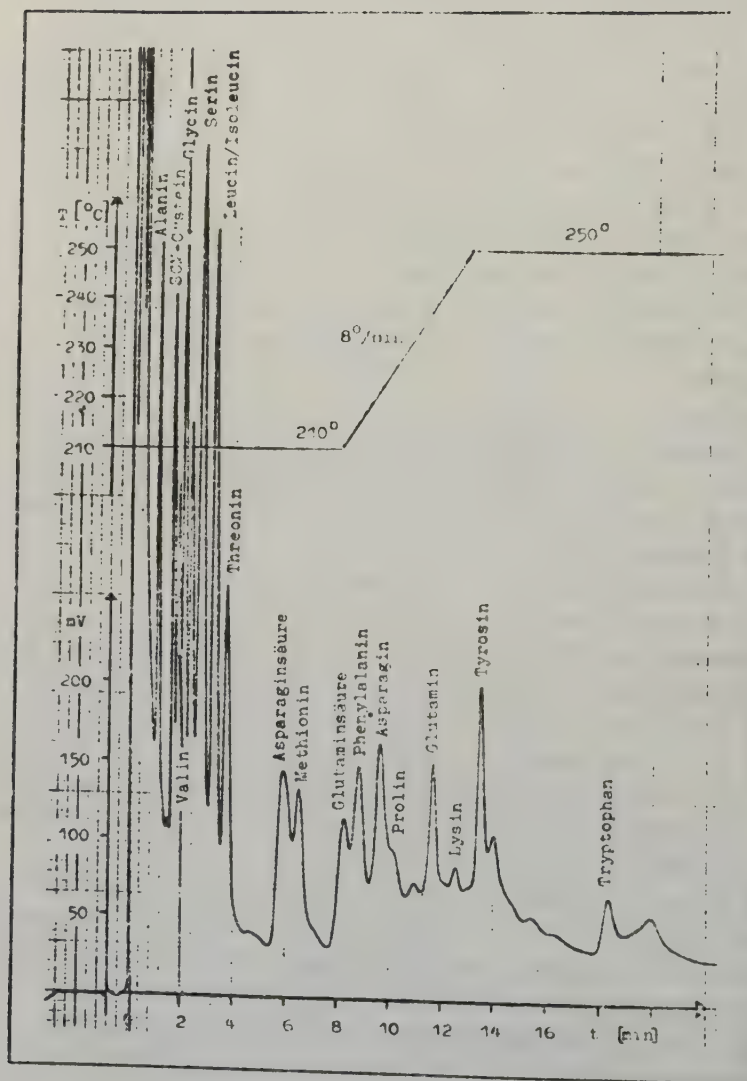


Abb. 12: Chromatogramm von je 10 nmol der TMS-Derivate der Standard-PTH-Aminosäuren: Programm II, Säule B

die nah beieinanderliegende Retentionszeiten haben.
Die Analysenzeit beträgt 10 min.

Programm IV für Säule A ermöglicht schließlich den quantitativen Nachweis der nach der Äthylacetat-Extraktion (3.4.3.1.) in der wässrigen Phase verbleibenden drei PTH-Aminosäuren

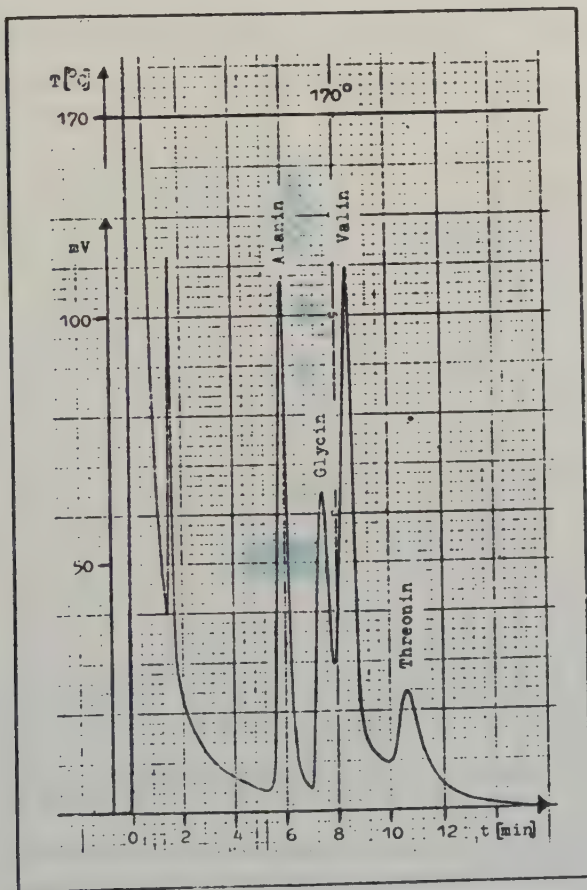


Abb. 13: Chromatogramm von je 10 nmol PTH-Alanin, PTH-Glycin, PTH-Valin und PTH-Threonin; Programm III, Säule B

Arginin

Cysteinsäure

Histidin

Um flüchtige Derivate zu erhalten, müssen diese PTH-Aminosäuren N-acyliert werden. Abbildung 14 zeigt die Auftrennung von je 10 nmol acylierter Standard-PTH-Aminosäure. Nach der Probeneingabe wird die Anfangs-

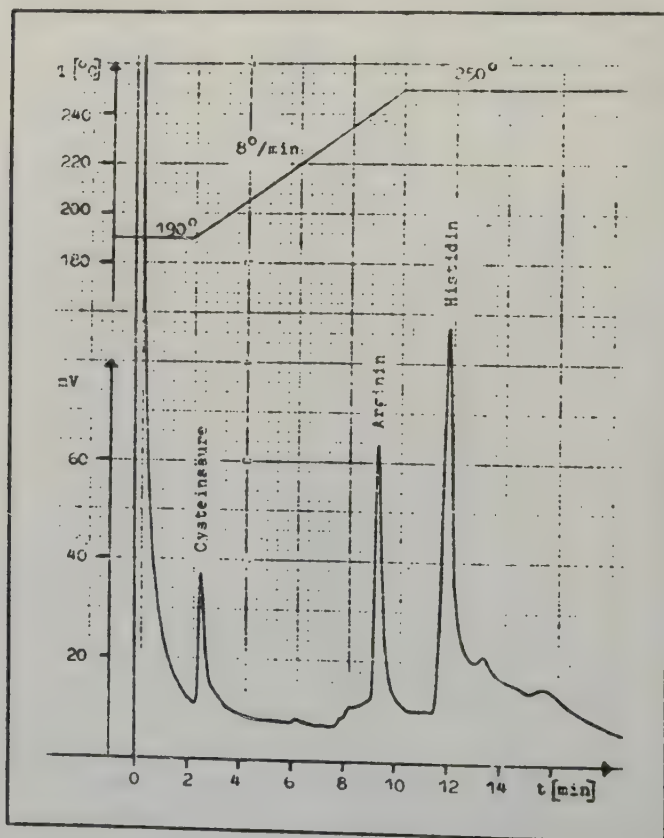


Abb. 14: Chromatogramm von je 10 nmol der N-acylierten Standard-PTH-Aminosäuren Arginin, Histidin und Cysteinsäure; Programm IV, Säule A

temperatur von 190°C für 2 min beibehalten. Dann wird mit einem Temperaturgradienten von 8°C/min auf die konstante Endtemperatur von 250°C aufgeheizt. Die Analysenzeit beträgt 14 min.

4.3.4. Probenaufbereitung

Die nach der thermischen oder hydrolytischen Umlagerung (3.4.3.) getrockneten Sequenatorfraktionen werden für die einzelnen Programme nach folgenden Methoden für die gaschromatographischen Untersuchungen vorbereitet.

4.3.4.1. Chemikalien

Äthylacetat, sequenal grade

Acetonitril, sequenal grade

N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamid (BSA), Pierce Chemical

Acetanhydrid

Pyridin

4.3.4.2. Lösung der Proben

Die Sequenatorfraktionen werden nach der thermischen Umlagerung in 50 µl Äthylacetat-Acetonitril (1:1) gelöst. Ebenso werden die getrockneten Äthylacetat- und wässrigen Phasen der hydrolytischen Umlagerung behandelt. Mit den Programmen I und III werden Anteile von 2 bis 5 µl direkt gaschromatisch analysiert.

4.3.4.3. Silylierung

10 µl der Äthylacetat-Acetonitrillösung von 4.3.4.2. werden in einem Plastikröhrchen mit dem gleichen Volumen BSA versetzt. Das Röhrchen wird gut verschlossen und 15 min auf 80°C erhitzt. Anschließend wird sofort mit Programm II analysiert, da die TMS-Derivate nicht stabil sind.

4.3.4.4. Acylierung

10 µl der Äthylacetat-Acetonitrillösung von 4.3.4.2. wird mit dem gleichen Volumen Acetanhydrid-Pyridin (4:1) gemischt und sofort mit Programm IV analysiert. Die Acylierung läuft wahrscheinlich erst im Einspritzblock des Gaschromatographen ab.

4.3.4.5. Glutaminsäure und Asparaginsäure aus derivatisierten Peptiden

Bei der Derivatisierung von Peptiden mit EDC und ANS reagieren auch die freien Carboxylgruppen von Glutaminsäure und Asparaginsäure mit ANS nach der Reaktionsgleichung 13 (3.4.4.). Die PTH-Derivate dieser Aminosäuren verbleiben dann nach einer hydrolytischen Umlagerung in der wässrigen Phase. Diese werden wie in 4.3.4.2. beschrieben gelöst und nach 4.3.4.3. silyliert. Anschließend wird mit Programm II analysiert.

4.3.5. Auswertung der Chromatogramme

Mit Hilfe der Standard-PTH-Aminosäuren werden für jede PTH-Aminosäure und ihre Derivate Eichfaktoren bestimmt. Die Differentialchromatogramme der gaschromatographischen Analysen werden durch Integration ausgewertet. Die der Substanzmenge proportionale Fläche (F) unter den Peaks wird nach Gleichung 16 berechnet aus der gemessenen

$$F = h \cdot b_{1/2} \quad (16)$$

senen Peakhöhe (h) und der Breite des Peaks in halber Höhe ($b_{1/2}$). Die gesuchte Substanzmenge ergibt sich dann aus Gleichung 17.

$$\text{Peakfläche} \times \text{Eichfaktor} = \text{Menge} \quad (17)$$

Überlappende, unsymmetrische und schlecht aufgelöste Peaks werden in Dreiecke und Trapeze zerlegt und nach Gleichung 18 berechnet aus den gemessenen Höhen des Dreiecks (h_D) und des Trapezes (h_T), der Basis des

$$F = h_D \cdot g/2 + h_T \cdot \bar{p} \quad (18)$$

Dreiecks (g) und dem Mittelwert ($\bar{p}$) der Trapezparallelen.

4.4. Dünnschichtchromatographie

Neben der Gaschromatographie kommen noch zwei dünn-
schichtchromatographische Trennungen ergänzend zur An-
wendung. Sie erlauben zwar nur eine grobe quantitative
Abschätzung, tragen aber wesentlich zur Abkürzung der
gesamten Analysenzeit bei, da gleichzeitig mehrere Pro-
ben nebeneinander und parallel zur Gaschromatographie
untersucht werden können.

4.4.1. Trennung von PTH-Valin und PTH-Glycin

An Stelle einer zusätzlichen gaschromatographischen
Trennung mit Programm III läßt sich auch eine Dünn-
schichtchromatographie mit dem Trennsystem von Kulbe
(40) rasch und zuverlässig durchführen. Mit diesem
System ist im Prinzip eine Trennung aller PTH-Amino-
säuren möglich. In der Praxis hat sich jedoch gezeigt,
daß die vom Sequenator erhaltenen PTH-Aminosäuren teil-
weise andere R_F -Werte haben als die Standard-PTH-Amino-
säuren. Die R_F -Werte werden außerdem durch die Gegen-
wart anderer PTH-Aminosäuren und Nebenprodukte des Ed-
man-Abbaus beeinflusst.

4.4.1.1. Materialien

Stationäre Phase: Micropolyamid-Platten F-1700, doppel-
seitig beschichtet, Schleicher und Schüll, Dassel; for-
matisiert auf 5 x 5 cm

Laufmittel: Toluol/n-Pentan/Essigsäure (60:30:16) mit
250 mg/l PBD als Fluoreszenzindikator

2-Phenyl-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazol (PBD)

Standard-PTH-Aminosäuren

4.4.1.2. Arbeitsbedingungen

Temperatur: Raumtemperatur

Laufzeit: bis zur Oberkante der 5 x 5 cm-Platten, etwa
10 - 12 min

Nachweis: Bei der Betrachtung im ultravioletten Licht
(254 nm) erscheinen die chromatographierten Substanzen
als dunkle Flecke durch die Unterdrückung der Fluores-

zenz des Indikators.

Ein typisches Chromatogramm der Standard-PTH-Aminosäuren Valin und Glycin und dreier Fraktionen aus dem Abbau von Proteinaseinhibitor I_2^B aus Bäckerhefe zeigt das Ultraviolett-Foto in Abbildung 15.

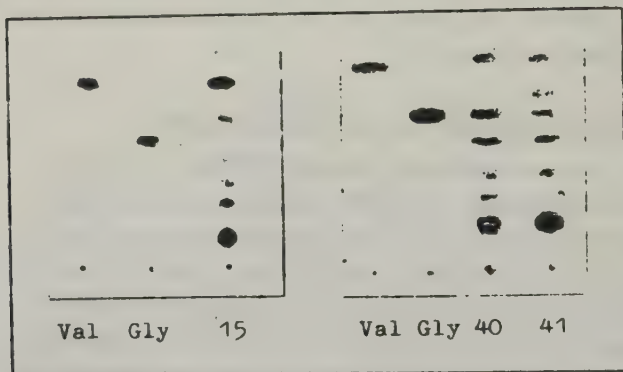


Abb. 15: Dünnschichtchromatographie von PTH-Glycin und PTH-Valin und den Fraktionen 15, 40 und 41 aus Proteinaseinhibitor I_2^B

4.4.2. Trennung von PTH-Arginin, PTH-Cysteinsäure und PTH-Histidin

Diese drei PTH-Aminosäuren aus der wässrigen Phase der Thiazolinon-Umlagerung lassen sich ebenfalls nebeneinander dünn-schichtchromatographisch oder durch Spot-tests nachweisen (40, 49 - 51). In der praktischen Anwendung sind mit allen Methoden jedoch keine befriedigenden Ergebnisse erzielt worden. Es findet deshalb ein modifiziertes System Anwendung. Nebenprodukte des Edman-Abbaus laufen dabei langsamer als die drei PTH-Aminosäuren, eventuell vorhandene andere PTH-Aminosäuren laufen wesentlich schneller. Das Verfahren kann des-

halb auch nach der thermischen Umlagerung in Gegenwart anderer PTH-Aminosäuren benutzt werden.

4.4.2.1. Materialien

Stationäre Phase: DC-Alufolie, Kieselgel F₂₅₄ mit Fluoreszenzindikator, Merck AG, Darmstadt; formatisiert auf 10 x 20 cm

Laufmittel: Toluol/Äthanol/Wasser/Eisessig/Dimethylformamid (50 : 47,5 : 2,5 : 0,5 : 5 Volumenanteile)

Methanol

Standard-PTH-Aminosäuren

4.4.2.2. Arbeitsbedingungen

Temperatur: Raumtemperatur

Laufzeit: etwa 20 min, 9 cm bis Plattenoberkante

Auftrag: Analysenproben und Standards werden in

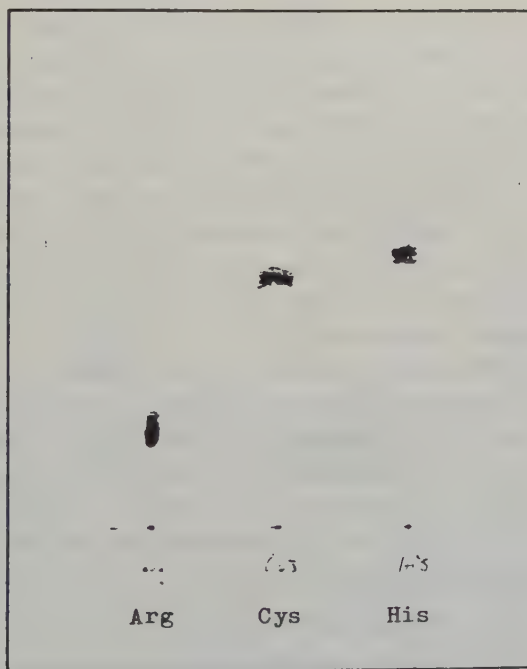


Abb. 16: Dünnschichtchromatographie von PTH-Arginin, PTH-Cysteinsäure und PTH-Histidin

Methanol gelöst aufgetragen.

Nachweis: Die chromatographierten PTH-Aminosäuren werden bei der Betrachtung der Dünnschichtplatten unter UV-Licht durch die Unterdrückung der Fluoreszenz des Induktors als dunkle Flecke sichtbar. PTH-Histidin zeigt sich zusätzlich nach einiger Zeit durch eine intensive gelbe Färbung an. Bei jeder Analyse läuft ein Gemisch der Standard-PTH-Aminosäuren zum direkten Vergleich mit. Eine Trennung der drei Standard-PTH-Aminosäuren zeigt das Ultraviolettphoto in Abbildung 16.

Nachweisgrenze: 0,5 - 1,0 nmol

4.5. Diskussion

Mit den angegebenen Methoden ist der quantitative Nachweis aller PTH-Derivate der in natürlichen Peptiden und Proteinen vorkommenden Aminosäuren nebeneinander möglich. Die Durchführung sämtlicher Trennungsgänge für jede Fraktion des Edman-Abbaus erübrigt sich dabei in den meisten Fällen. Es ist nur erforderlich, alle PTH-Aminosäuren einer Fraktion quantitativ zu bestimmen, wenn bei fortgeschrittenem Abbau zur richtigen Interpretation des Analysenergebnisses sämtliche Overlaps herangezogen werden müssen.

Die nach den Ausführungen über den Edman-Abbau und die Identifizierung von PTH-Aminosäuren für die Durchführung einer Sequenzanalyse erforderlichen Arbeitsschritte lassen sich zu einem Verfahrensablauf zusammenfassen. In den Abbildungen 17 und 18 ist dieser für Proteine und Peptide als Blockschema auf den beiden folgenden Seiten dargestellt.

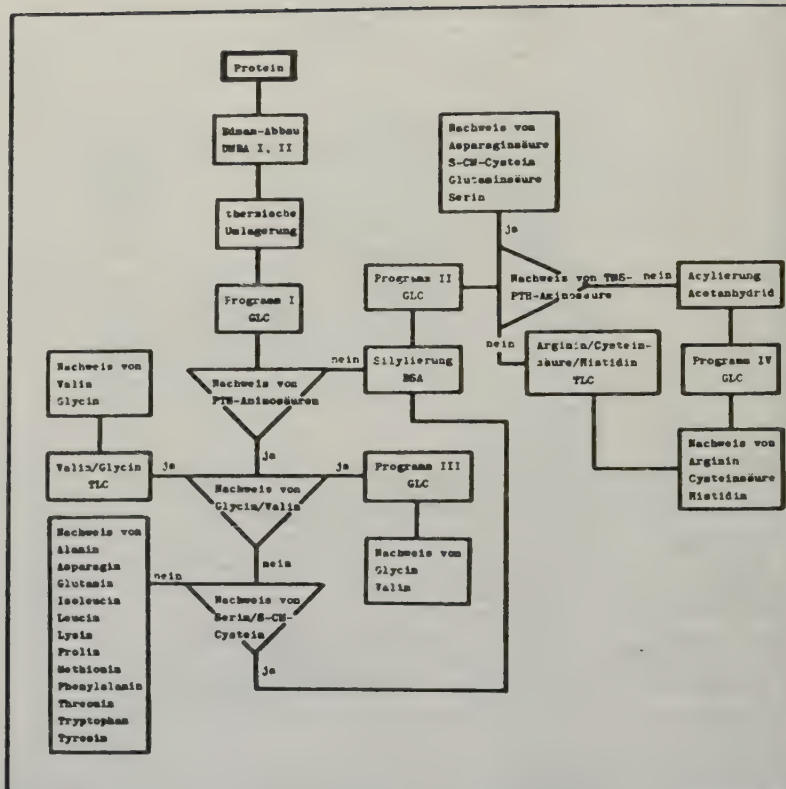


Abb. 18: Sequenzierung von Proteinen, Verfahrensgang zum Abbau und Nachweis der Aminosäuren mit Gaschromatographie (GLC) und Dünnschichtchromatographie (TLC)

5. Untersuchungen zur Primärstruktur von

fetalem Fibrinogen

5.1. Grundlagen

Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Kapitel 2) sind ein weiterer Beweis für die Existenz der molekularen Variante "fetales Fibrinogen". Nachgewiesen sind bisher außerdem mindestens drei differierende tryptische Peptide, ein doppelt so hoher Gehalt an O-Phosphoserin, eine höhere negative Ladung bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose und eine unterschiedliche Beeinflussung der Gerinnungszeit durch Ionenstärke und pH-Wert (9 - 12, 52). Die Gerinnungshemmung des fetalen Fibrinogens bei pH 9 läßt sich auch im Plasma nachweisen. Es ist damit gezeigt worden, daß der Anteil an fetalem Fibrinogen im Blut des menschlichen Neugeborenen in den ersten Lebenstagen kontinuierlich abnimmt. Fetales Fibrinogen ist etwa acht Tage lang beim Neugeborenen nachweisbar. Das Neugeborene beginnt vermutlich in dieser Zeit mit der Produktion von adultem Fibrinogen. Dies steht im Einklang mit einer Halblebenszeit des Fibrinogens von $4,14 \pm 0,56$ Tagen, die mit ^{131}J - oder ^{125}J -markiertem Fibrinogen im menschlichen Organismus gemessen worden ist (53).

In Analogie zum Vorkommen des humanen fetalen Hämoglobins HbF (54) ist der Schluß naheliegend, daß auch beim fetalen Fibrinogen eine andere Sequenz der Aminosäuren in der Primärstruktur der einzelnen Peptidketten vorliegt. Darauf weist auch das Auftreten von drei unterschiedlichen tryptischen Peptiden hin.

Beim adulten Fibrinogen ist die Aminosäuresequenz der Peptidketten schon in einigen Teilbereichen bekannt (55 - 57). Dabei ist die γ -Kette am intensivsten untersucht. Die Ursache dafür ist, daß sie nach den gebräuch-

lichen Präparationsmethoden etwas leichter zugänglich ist gegenüber den beiden anderen Ketten.

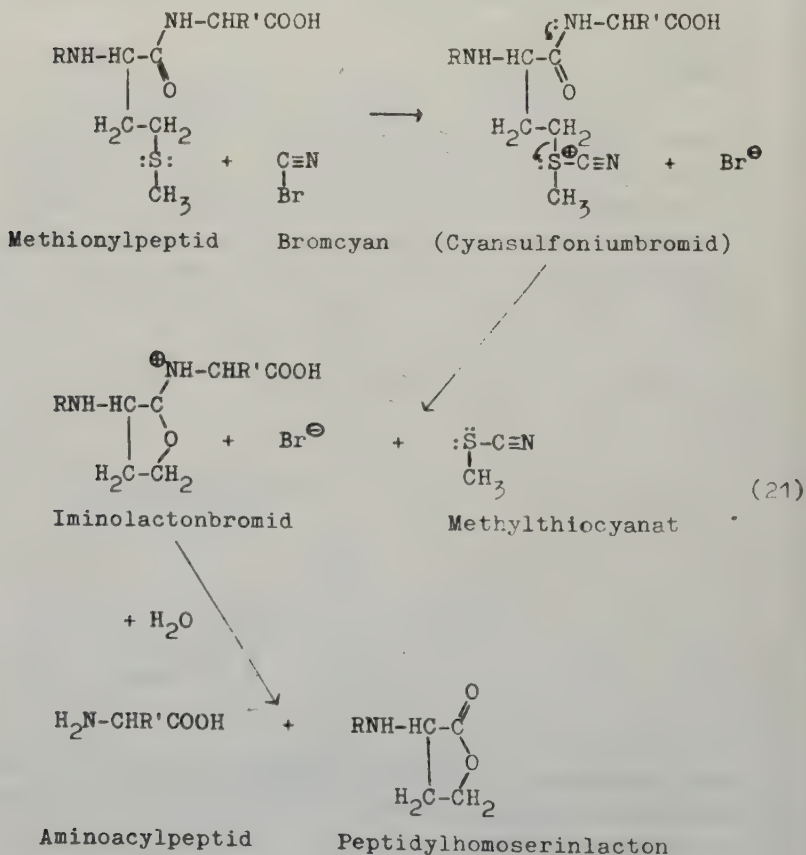
Die quantitative Aminosäurezusammensetzung von adultem Fibrinogen nach den Angaben von Henschen (58) zeigt Tabelle 8. Die berechneten Werte sind auf die ebenfalls in der Tabelle aufgeführten und von verschiedenen Autoren bestimmten Molekulargewichte (59 - 61) bezogen. Die Ta-

	Fibrinogen	$\alpha(A)$	$\beta(B)$	γ
Molekulargewicht	340000	63500	56000	47000
Alanin	141,1	20,6	23,4	23,0
Arginin	142,8	33,7	25,0	10,2
Asparaginsäure	381,1	65,2	61,8	53,3
Cystein	55,8	7,4	9,6	8,1
Glutaminsäure	348,2	59,3	52,9	46,5
Glycin	287,6	55,8	42,4	33,2
Histidin	55,8	11,9	7,8	9,0
Isoleucin	115,6	17,7	16,5	20,8
Leucin	176,5	29,7	28,4	24,4
Lysin	214,5	37,6	34,2	31,2
Methionin	65,6	10,4	14,6	7,8
Phenylalanin	85,0	14,7	9,8	16,0
Prolin	134,3	33,6	24,8	11,8
Serin	254,7	71,1	36,5	25,1
Threonin	184,6	40,4	25,4	25,7
Tryptophan	60,9	9,1	11,0	8,0
Tyrosin	98,9	11,4	19,9	18,3
Valin	134,6	25,1	24,1	13,7
Σ	2907,6	554,7	468,1	386,1

Tab. 8: Aminosäurereste in adultem Fibrinogen und den drei Peptidketten, bezogen auf die angegebenen Molekulargewichte.

Zur Aufklärung der Primärstruktur dieser noch recht großen Peptidketten ist es erforderlich, sie durch spezifische chemische oder enzymatische Reaktionen in kleinere Untereinheiten zu spalten (66).

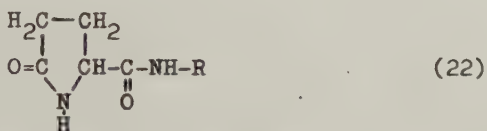
Als Beispiel für eine chemische Spaltung sei hier die Reaktion mit Bromcyan (67) gezeigt, die ein Protein sehr spezifisch an den Methionylbindungen spaltet. Der Reaktionsablauf folgt dem Mechanismus



Wird die γ -Kette mit Bromcyan behandelt, so sind entsprechend den acht vorkommenden Methioninresten neun Peptide zu erwarten, von denen für das adulte Fibrin von Henschen (55) bisher acht isoliert wurden.

Eine spezifische enzymatische Spaltungsreaktion ist beispielsweise die durch Thrombin bewirkte Abspaltung der Fibrinopeptide A und B an den Arginyl-Glycyl-Bindungen bei der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin nach der Gleichung 2 (Kap. 2.1.).

Die N-terminale Aminosäure des Fibrinopeptids B ist Pyroglutaminsäure:



Dieser Pyrrolidinyllring wird beim Edman-Abbau nicht geöffnet, und damit findet keine Abspaltung der endständigen Aminosäure statt. Das Peptid B ist blockiert. Wird die Kettenisolierung jedoch nach der Abspaltung der Fibrinopeptide A und B durch Thrombin durchgeführt, dann ist auch die β -Kette einer Sequenzanalyse durch den Edman-Abbau zugänglich.

5.2. Aufgabenstellung

Mit den in den Kapiteln 3 und 4 beschriebenen Methoden zur Sequenzanalyse von Proteinen und Peptiden soll untersucht werden, ob Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen fetalem und adultem Fibrinogen vorhanden sind. In diesem Kapitel sollen zunächst die Methoden zur Isolierung der Peptidketten und deren Fragmente behandelt werden, die einem Edman-Abbau unterworfen wurden. Dann werden die Ergebnisse der Sequenzanalysen mit den bereits bekannten Aminosäuresequenzen verglichen.

5.3. Methoden

Es werden die Arbeitsgänge beschrieben, die nach der Gewinnung von fetalem Fibrinogen zur Trennung der drei

Peptidketten und zur Isolierung von Spaltstücken der 7-Kette erforderlich sind. Um in der α -Kette etwas weiter in der Sequenzierung zu gelangen und in der β -Kette diese überhaupt zu ermöglichen, wird auch eine Trennung der Ketten nach der Umwandlung in Fibrin durchgeführt.

5.3.1. Präparation von fetalem Fibrinogen und Fibrin

Die Gewinnung von fetalem Fibrinogen und die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgt nach den in 2.3.1. und in 2.3.3. gegebenen Vorschriften. Fetales Fibrin wird anschließend durch Abspaltung der Fibrinopeptide A und B mit Thrombin nach Gleichung 2 hergestellt.

5.3.1.1. Materialien

lyophilisiertes fetales Fibrinogen

Kaliumchlorid

0,1N Natronlauge

Rinder-Thrombin

5.3.1.2. Arbeitsvorschrift

Mit 500 mg Fibrinogen wird eine 0,5 - 0,6 %ige Lösung in einer 0,3 M Kaliumchloridlösung hergestellt. Die Lösung wird mit 0,1 N Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt. Zu dieser Lösung wird soviel Rinderthrombin zugegeben, daß eine Endkonzentration von 1 NIH-Einheiten/ml erreicht wird. Danach wird diese Lösung 16 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Fibrin-Clot wird dann mit einem Glasstab herausgenommen, ausgedrückt und in einem Büchner-Trichter mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Zur Entfernung des Waschwassers wird 30 min Luft durchgesaugt. Mit dem Fibrin wird dann wie mit Fibrinogen die in 5.3.2. beschriebene Kettentrennung vorgenommen.

5.3.2. Reduktion, S-Carboxymethylierung und Kettenisomerisierung von fetalem Fibrinogen und Fibrin

Der Arbeitsgang ist für Fibrinogen und Fibrin gleich und wird wie bei adultem Material durchgeführt (58, 64, 65, 66)

5.3.2.1. Materialien

Dithiothreitol (DTT, Cleland's Reagenz), A grade

Amberlite MB-3, Mischbett-Ionenaustauscherharz

10 M deionisierte Harnstofflösung

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)

Stickstoff, 99,995 % N₂

Jodessigsäure

0,4 M Natronlauge

Essigsäure, indifferent gegen Chromsäure, 100 %

G 25 Sephadex

G 50 Sephadex

CM-Cellulose Ionenaustauscher Servacel

SP-Sephadex C 50

Elutionsmittel:

50 % Essigsäure

10 % Essigsäure

8 M Harnstoff, 0,1 M Essigsäure auf pH 5,1 eingestellt
mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer

8 M Harnstoff, 0,1 M Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt
mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer

8 M Harnstoff, 0,075 M Natriumacetat auf pH 4,8 ein-
gestellt mit Essigsäure

8 M Harnstoff, 0,5 M Natriumacetat auf pH 5,4 einge-
stellt mit Essigsäure

Chromatographierohre für

G 25 Sephadex: 5 x 81 cm, 1590 ml

G 50 Sephadex: 5 x 44 cm, 864 ml

CM-Cellulose: 2,5 x 50 cm, 245 ml

SP-Sephadex C 50: 1,5 x 80 cm, 145 ml

5.3.2.2. Reduktion und S-Carboxymethylierung:

500 mg Fibrinogen beziehungsweise Fibrin werden in

50 ml 10 M Harnstofflösung gelöst. Die Harnstofflösung

muß frisch angesetzt und mit Amberlite MB-3 deionisiert

sein. Sie enthält 0,02 M DTT bei einem mit 0,1 M Tris-

HCl-Lösung eingestellten pH von 8,0. Vor und nach der

Zugabe des Proteins wird die Lösung in einer Waschflasche

mit Stickstoff gespült. Danach wird die Lösung 4 h bei

37°C im Wasserbad geschüttelt. Im Dunkeln wird dann un-

ter Rühren portionsweise Jodessigsäure bis zu einer Endkonzentration von 0,08 M zugegeben. Durch Zugabe von 0,4 M Natronlauge wird die Lösung dabei ständig auf pH 8 gehalten. Nach der Zugabe von Jodessigsäure wird noch 1 h im Dunkeln gerührt und dann mit dem gleichen Volumen 100 %iger, gegen Chromsäure indifferenten Essigsäure versetzt.

5.3.2.3. Reinigung und Isolierung der Peptidketten:

Zur Abtrennung von überschüssigen Reagenzien und Nebenprodukten wird die Reaktionsmischung von 3.3.2.2. im Dunkeln über eine G 25 Sephadex-Säule gegeben und mit 50 %iger Essigsäure eluiert. Das Eluat wird in 5 ml-Fractionen gesammelt. Die nach der Extinktionsmessung bei 280 nm proteinhaltigen Fractionen werden vereinigt und lyophilisiert. Die Ausbeute nach der Gelfiltration beträgt nach der photometrischen Bestimmung nach Warburg-Kalckar (69) etwa 450 mg, das entspricht 90 %.

Zur Auftrennung in die einzelne Ketten wird das Lyophilisat an einer CM-Cellulose-Säule chromatographiert. Das in 20 ml Startpuffer gelöste Lyophilisat wird auf die in Startpuffer equilibrierte CM-Cellulose gegeben und mit einem linearen Gradienten aus je 2000 ml Startpuffer und zweitem Puffer gegeben. Startpuffer: 8 M Harnstoff, 0,1 M Essigsäure, mit Tris eingestellt auf pH 5,1. Zweiter Puffer: 8 M Harnstoff, 0,1 M Essigsäure, mit Tris eingestellt auf pH 5,8. Das Eluat wird in 5-ml-Fractionen gesammelt. Ein charakteristisches Elutionsdiagramm, das durch Extinktionsmessung bei 280 nm erhalten wird, zeigt Abbildung 19. Die Fractionen unter den Peaks werden vereinigt und lyophilisiert.

Nach der Lyophilisation werden die Ketten durch Gelfiltration an einer G-50-Sephadex-Säule in 10 %iger Essigsäure vom Harnstoff gereinigt. Die Ausbeute beträgt pro Kette etwa 40 mg, das entspricht rund 25 % des eingesetzten Fibrinogens.

Da die Ausbeuten sehr gering sind, wird vor allem zur Präparation der α -Kette auch eine Kettentrennung an SP-

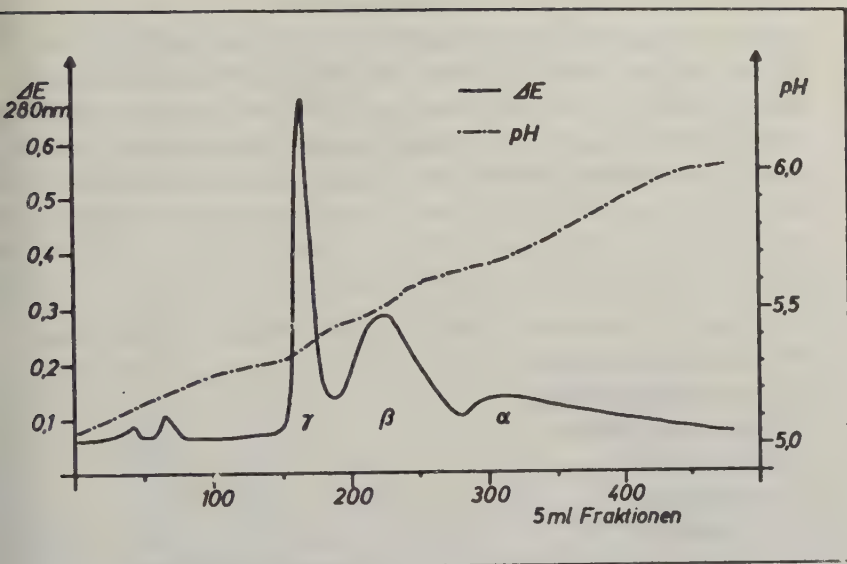


Abb. 19: Elutionsdiagramm einer Kettentrennung an CM-Cellulose

Sephadex C 50 durchgeführt (65). Die Gesamtausbeute beträgt hierbei 75 % und die Ketten sind wesentlich sauberer getrennt. Die Peptidketten werden auf eine mit Startpuffer (8 M Harnstoff, 0,075 M Natriumacetat, pH 4,8) equilibrierte SP-Sephadex-Säule aufgetragen und mit einem linearen Gradienten aus Startpuffer und einem zweiten Puffer (8 M Harnstoff, 0,5 M Natriumacetat, pH 5,4) eluiert. Der für die Puffer verwendete Harnstoff muß vor dem Gebrauch mit Amberlite MB-3 deionisiert werden. Das Elutionsdiagramm entspricht dem in Abbildung 19 dargestellten Diagramm der Trennung an CM-Cellulose.

5.3.3. Spaltung der 7-Kette an den Methionylbindungen durch Bromcyan und Trennung der Peptide

Da bei der Kettenisolierung die 7-Kette im Verhältnis zu den beiden anderen Ketten wesentlich reiner und in etwas höherer Ausbeute erhalten wird, ist es naheliegend zunächst bei dieser eine Spaltung mit Bromcyan zu versuchen. Die Peptide sollen wie bereits für die adulte 7-Kette von Henschen (70) beschrieben, voneinander getrennt werden.

5.3.3.1. Materialien

Bromcyan, frisch sublimiert, reinst, Serva, Heidelberg

70 %ige Ameisensäure

4 %ige Ameisensäure

10 %ige Essigsäure

G 50 Sephadex

G 25 Sephadex

G 10 Sephadex

Cellulose-Ionenaustauscher P 23, Servacel, Serva,

CM-Cellulose-Ionenaustauscher, Servacel

8 M Harnstoff, 0,1 M Essigsäure, eingestellt mit 0,1 M
Tris-Lösung auf pH 4,1

8 M Harnstoff, 0,1 M Essigsäure, eingestellt mit 0,1 M
Tris-Lösung auf pH 6,2

Chromatographierohre für

Sephadex: 2,5 x 90 cm, 442 ml

Ionenaustauscher: 1 x 25 cm, 20 ml

5.3.3.2. Bromcyanspaltung

125 mg fetale 7-Kette werden in 5 ml 70 %iger Ameisensäure gelöst und mit 5 ml einer frisch angesetzten Lösung von 750 mg frisch sublimiertem BrCN in 70 %iger Ameisensäure versetzt. Die Lösung wird 20 - 25 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach werden Lösungsmittel und überschüssiges Reagenz am Rotationsverdampfer verflüchtigt. Nach dem Einengen wird das Reaktionsprodukt in 20 ml 10 %iger Essigsäure aufgenommen und lyophilisiert.

3.3.3. Trennung des Peptidgemisches

Die Peptide werden durch Gelfiltration voneinander getrennt.

Das Lyophilisat der Bromcyanspaltung wird in 20 ml 10 %iger Essigsäure gelöst auf eine G-50-Sephadex-Säule aufgetragen und mit 10 %iger Essigsäure eluiert. Das Elutionsdiagramm nach dem Auffangen in 2,5 ml-Fraktionen und Extinktionsmessung bei 280 nm zeigt Abbildung 20. Die Fraktionen unter den Peaks werden vereinigt und lyophilisiert. Es werden Ausbeuten erhalten von CB I = 70 mg, CB II = 34 mg und CB III = 10 mg.

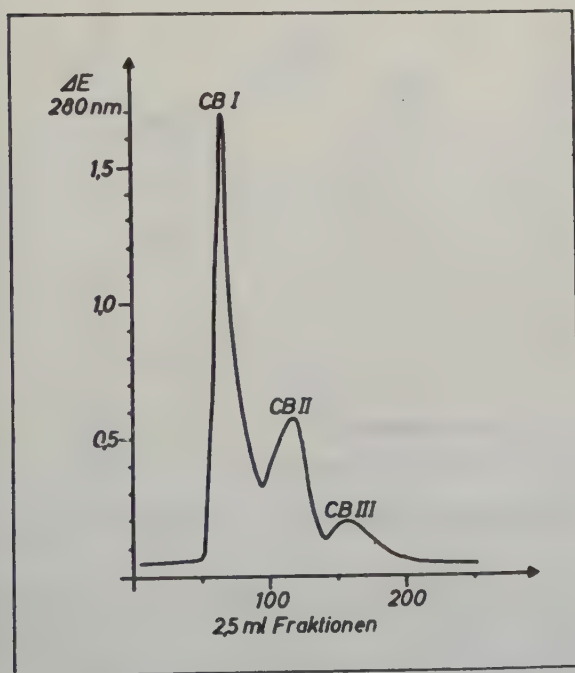


Abb. 20: BrCN-Peptide getrennt an G 50 Sephadex

Pool CB I wird an einer Phosphocellulose-Säule (1 x 25 cm) mit einem linearen Gradienten aus je 350 ml Start-

puffer (8 M Harnstoff, 0,1 M Essigsäure, pH 4,1, eingestellt mit Tris) und einem zweiten Puffer gleicher Zusammensetzung, jedoch mit Tris auf pH 6,2 eingestellt, chromatographiert. Das Elutionsdiagramm ist in Abbildung 21 wiedergegeben. Die gepoolten 2,5 ml-Fractionen werden an einer G-25-Sephadex-Säule (2,5 x 90 cm) in 10 %iger Essigsäure entsalzt. Die Ausbeuten sind $CB I_A = 6$ mg und $CB I_B = 32$ mg. $CB I_A$ ist nach den Angaben von Henschen das N-terminale Peptid der 7-Kette mit den Aminosäuren 1 - 78. $CB I_B$ ist das größte bei der BrCN-Spaltung auftretende Peptid mit den Aminosäuren 95 - 250

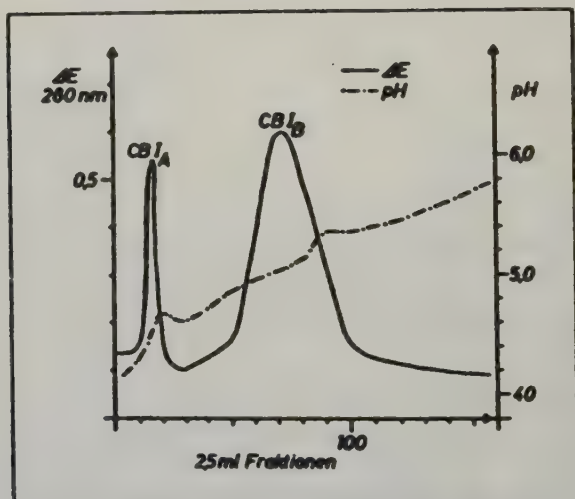


Abb. 21: Chromatographie von CB I an Phosphocellulose

Pool CB II wird an einer CM-Cellulose-Säule (1 x 25 cm) mit dem gleichen Puffersystem wie CB I chromatographiert. Das Elutionsdiagramm der 2,5 ml-Fractionen zeigt Abbildung 22. Der Peptidgehalt beträgt pro Peak etwa 2 mg. Eine Entsalzung an einer G-10-Sephadex-Säule (2,5 x 90 cm) in 4 %iger Ameisensäure zeigt nicht den gewünschten Erfolg. Die Peptide lassen sich nicht vollständig vom Harnstoff trennen, sodaß die bei dieser Trennung zu er-

wartenden Peptide bisher noch nicht in ausreichender Menge und Reinheit für eine Sequenzanalyse zur Verfügung standen.

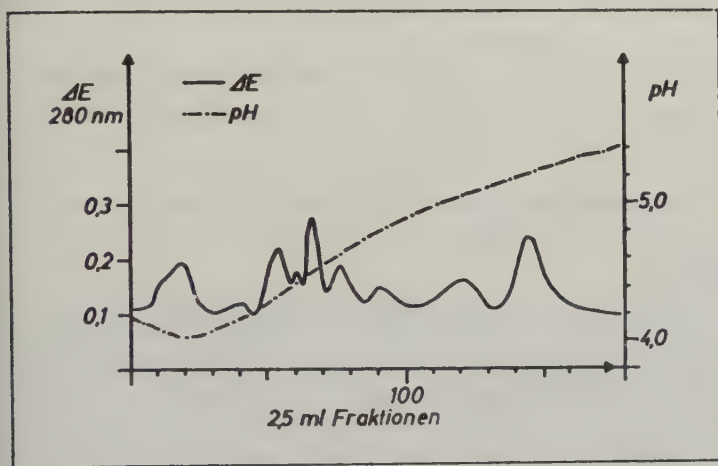


Abb. 22: Elutionsdiagramm der Chromatographie von CB II an CM-Cellulose

Pool CB III soll nach den Angaben von Henschen zwei Peptide enthalten, von denen eines, das die Aminosäuren 90 - 94 enthält, in 0,1 M Essigsäure löslich ist. Nach dem Behandeln des Lyophilisats von CB III mit 0,1 M Essigsäure ist ein Anteil CB III_A von 1,3 mg gelöst. Er enthält das erwartete Peptid, daneben jedoch noch geringe Mengen eines weiteren Peptids, wahrscheinlich ist es das Peptid 79 - 89. An dem in 0,1 M Essigsäure unlöslichen Anteil CB III_B ließ sich bisher noch kein Edman-Abbau durchführen.

5.3.4. Sequenzanalysen

Mit Hilfe des automatischen Edman-Abbaues sind beim fetalen Fibrinogen und Fibrin an folgenden Peptidketten Sequenzanalysen durchgeführt worden:

α (A)- und α -Kette,

β -Kette,

γ -Kette,

mit Programm DMBA I, außerdem nach der Spaltung der γ -Kette mit Bromcyan an den Peptiden

CB I_A, CB I_B

mit Programm DMBA I und am Peptid

CB III_A

nach Derivatisierung mit EDC und ANS mit Programm DMBA II.

5.4. Ergebnisse und Diskussion

Für die Aminosäuresequenz von fetalem Fibrinogen liegt bisher folgendes Ergebnis vor:

α (A)-Kette:

Ala - Asp - Ser - Gly - Glu - Gly - Asp - Phe - Leu - Ala - 10
- Glu - Gly - Gly - Gly - Val - Arg - Gly - Pro - Arg - Val - 20
- Val - Glu - Arg - His - Gln - Ser - Ala - Cys - Lys - Asp - 30
- Ser - Asp - Trp - Pro - Phe - Cys - Ser - Asp - Glu - Asp - 40
- Trp - - -

Die Aminosäuren sind mit folgenden Ausbeuten nachgewiesen worden:

Nr.	AS	%	Nr.	AS	%	Nr.	AS	%
1	Ala	47	15	Val	10	29	Lys	17
2	Asp	16	16	Arg	TLC	30	Asp	29
3	Ser	9	17	Gly	62	31	Ser	12
4	Gly	29	18	Pro	49	32	Asp	18
5	Glu	26	19	Arg	TLC	33	Trp	9
6	Gly	17	20	Val	54	34	Pro	8
7	Asp	11	21	Val	48	35	Phe	15
8	Phe	20	22	Glu	42	36	Cys	6
9	Leu	13	23	Arg	TLC	37	Ser	4
10	Ala	11	24	His	TLC	38	Asp	7
11	Glu	4	25	Gln	16	39	Glu	6
12	Gly	9	26	Ser	18	40	Asp	6
13	Gly	10	27	Ala	24	41	Trp	3
14	Gly	13	28	Cys	22			

β (B)-Kette:

Das Fibrinopeptid B ist durch Pyroglutaminsäure blockiert. Sequenziert wurde deshalb erst nach Abspaltung des Peptids ab Aminosäure 15. Aminosäure 14 ist durch die Spezifität der Thrombinspaltung bestimmt.

- Arg - Gly - His - Arg - Pro - Leu - Asp - 20
- Lys - Lys - Arg - Glu - Glu - Ala - Pro - Ser - Leu - Arg - 30
- Pro - Ala - Pro - Pro - Pro - Ile - Ser - Gly - Gly - Gly - 40
- Tyr - Arg - Ala - Arg - Pro - Ala - Lys - Ala - Ala - Ala - 50
- Thr - - - -

Die Aminosäuren sind mit folgenden Ausbeuten nachgewiesen worden:

Nr.	AS	%	Nr.	AS	%	Nr.	AS	%
15	Gly	69	28	Ser	33	41	Tyr	9
16	His	TLC	29	Leu	39	42	Arg	TLC
17	Arg	TLC	30	Arg	TLC	43	Ala	11
18	Pro	44	31	Pro	27	44	Arg	TLC
19	Leu	42	32	Ala	34	45	Pro	9
20	Asp	36	33	Pro	22	46	Ala	10
21	Lys	32	34	Pro	26	47	Lys	6
22	Lys	33	35	Pro	27	48	Ala	8
23	Arg	TLC	36	Ile	31	49	Ala	8
24	Glu	33	37	Ser	14	50	Ala	9
25	Glu	37	38	Gly	19	51	Thr	6
26	Ala	49	39	Gly	22			
27	Pro	35	40	Gly	27			

γ -Kette:

Tyr - Val - Ala - Thr - Arg - Asp - Asn - Cys - Cys - Ile - 10
- Leu - Asp - Glu - Arg - Phe - Gly - Ser - Tyr - Cys - Pro - 20
- Thr - Thr - Cys - Gly - Ile - Ala - Asp - Phe - Leu - Ser - 30
- Thr - Tyr - Gln - Thr - Lys - Val - Asp - Lys - Asp - Leu - 40
- Gln - Ser - Leu -

..... - Met - Leu - 90

- Glu - Glu - Ile - Met - Lys - Tyr - Glu - Ala - Ser - Ile - 100
 - Leu - Thr - His - Asp - Ser - Ser - Ile - Arg - Tyr - Leu - 110
 - Gln - Glu - Ile - Tyr - Asn - Ser - Asn - Asn - Gln - Lys - 120
 - Ile - Val - Asn - Leu - Lys - Glu - Lys - Val - Ala - Gln - 130
 - Leu - Glu - Ala - Gln - Cys -

Die Sequenz wurde bestimmt aus der vollständigen Kette
 und aus den Peptiden

CB I_A = Aminosäuren 1 - 43

CB I_B = Aminosäuren 95 - 135

CB III_A = Aminosäuren 90 - 94

Die Aminosäuren sind mit folgenden Ausbeuten nachgewiesen worden:

Nr.	AS	%	Nr.	AS	%	Nr.	AS	%
1	Tyr	23	21	Thr	19	41	Gln	2
2	Val	53	22	Thr	23	42	Ser	3
3	Ala	33	23	Cys	15	43	Leu	4
4	Thr	44	24	Gly	8			
5	Arg	TLC	25	Ile	8			
6	Asp	75	26	Ala	9			
7	Asn	7	27	Asp	21	90	Leu	57
8	Cys	42	28	Phe	6	91	Glu	39
9	Cys	64	29	Leu	6	92	Glu	33
10	Ile	42	30	Ser	12	93	Ile	12
11	Leu	23	31	Thr	9	94	Met	3
12	Asp	41	32	Tyr	5			
13	Glu	36	33	Gln	3			
14	Arg	TLC	34	Thr	7			
15	Phe	13	35	Lys	7	95	Lys	12
16	Gly	11	36	Val	5	96	Tyr	22
17	Ser	36	37	Asp	5	97	Glu	46
18	Tyr	51	38	Lys	7	98	Ala	40
19	Cys	31	39	Asp	6	99	Ser	46
20	Pro	13	40	Leu	3	100	Ile	48

Nr.	AS	%	Nr.	AS	%	Nr.	AS	%
101	Leu	18	113	Ile	20	125	Lys	9
102	Thr	43	114	Tyr	13	126	Glu	9
103	His	TLC	115	Asn	5	127	Lys	11
104	Asp	14	116	Ser	16	128	Val	7
105	Ser	20	117	Asn	12	129	Ala	7
106	Ser	22	118	Asn	13	130	Gln	3
107	Ile	30	119	Gln	3	131	Leu	7
108	Arg	TLC	120	Lys	12	132	Glu	6
109	Tyr	12	121	Ile	7	133	Ala	7
110	Leu	24	122	Val	6	134	Gln	3
111	Gln	12	123	Asn	5	135	Cys	8
112	Glu	12	124	Leu	8			

Alle angeführten Sequenzen entsprechen den bereits bekannten Aminosäuresequenzen von adultem Fibrinogen.

Die Trennung der Peptide nach der Behandlung der γ -Kette mit Bromcyan ist bisher nicht in zufriedenstellender Ausbeute und Reinheit gelungen. Alle drei sequenzierten Peptide sind nicht einheitlich und enthalten jeweils 5 - 10 % mindestens eines weiteren Peptides. Bei den kürzeren Peptiden in CB II ist die Ausbeute zu gering, um nach einer vollständigen Entsalzung noch für den Edman-Abbau ausreichende Substanzmengen zu erhalten. Die weitere Fortführung dieser Untersuchungen wird darin bestehen, einerseits eine Aggregation der kleineren Peptide an die größeren nach der Bromcyanspaltung zu verhindern, andererseits muß Trennung und Ausbeute der Peptide durch Verwendung von flüchtigen Puffersystemen verbessert werden. Dies ist sehr wichtig, denn ein großes Problem ist die Beschaffung von Ausgangsmaterial. Folgende Überslagsrechnung mag das verdeutlichen: Zur Gewinnung von 50 mg fetalem Fibrinogen ist das Nabelvenenblut von etwa 150 Neugeborenen erforderlich. Daraus lassen sich etwa 5 mg γ -Kette präparieren.

Die Ausbeute von α - und β -Kette ist, wie aus Abb. 17 ersichtlich, noch geringer. Bei der α -Kette erhält man nur noch ein Drittel der bei der γ -Kette anfallenden Ausbeuten. Der Reinheitsgrad entspricht auch noch nicht den für eine Nachspaltung und weitere Untersuchungen gestellten Anforderungen. Weitere Arbeiten sind deshalb zur Isolierung hochgereinigter α -Kette erforderlich. Dies ist auch eine wesentliche Voraussetzung für Untersuchungen zur Heterogenität der α -Kette. Bei adultem Fibrinogen liegen etwa 20 - 25 % in der phosphorylierten Form α (AP) und weitere 10 - 20 % als α (AY)-Kette vor, bei der das Peptid A um eine Aminosäure verkürzt ist und mit Asparaginsäure beginnt. Es ist bisher nicht bekannt, ob bei den drei heterogenen Ketten noch andere Unterschiede in der Aminosäuresequenz vorkommen.

Bei fetalem Fibrinogen beträgt der Anteil der phosphorylierten Ketten 35 - 40 % (83). Ein eventuell differierender Anteil an α (AY)-Ketten wird erst nach der Verbesserung der Präparationsmethoden bestimmbar sein. Aus den bisher erhaltenen Ergebnissen können dafür keine Anhaltspunkte gefunden werden. Zudem ist nicht bekannt, ob und in welchem Ausmaß auch die α (AY)-Ketten phosphoryliert sind.

Rückschlüsse auf eine unterschiedliche Aminosäuresequenz bei fetalen und adulten α -Ketten lassen sich aus folgenden Tatsachen ziehen:

1. Es treten bei einer Spaltung des Fibrinogenmoleküls mit Trypsin drei unterschiedliche Peptide auf (9).
2. β - und γ -Kette zeigen bei tryptischer Spaltung an fetalem und adultem Material das gleiche Peptidmuster (84).
3. Fetales Fibrinogen hat gegenüber adultem Fibrinogen eine doppelt so hohe Affinität zu Thrombin. Die erhöhte Thrombinaffinität ändert sich nicht nach einer Einwirkung von Phosphatase (11).
4. Beim pathologischen Fibrinogen "DETROIT", das eine verminderte Gerinnbarkeit zeigt, ist in Position 19 in der α (A)-Kette Arginin durch Serin ersetzt.

6. Proteinase-Inhibitoren aus Hefe

=====

6.1. Grundlagen

Weitere sequenzanalytische Untersuchungen sind an Proteinase-Inhibitoren aus Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) vorgenommen worden.

Die Hefeproteinase A, B und die Carboxypeptidase Y (Proteinase C) werden durch Proteine inhibiert. Diese Inhibitoren wirken sehr spezifisch auf die jeweils entsprechende Proteinase. Auf Proteinase A wirken nur Proteinase-A-Inhibitoren (I^A) inhibierend (71) und auf Proteinase B nur Proteinase-B-Inhibitoren (I^B), (72). Proteinase-C-Inhibitor (I^C) beeinflusst ausschließlich Proteinase C (73 - 75). Die Proteinasen inaktivieren wiederum die Inhibitoren; und zwar werden I^A durch Proteinase B, I^B durch Proteinase A und I^C durch die Proteinase A und B inaktiviert. Die gegenseitige Beeinflussung ist in Tabelle 9 veranschaulicht.

	Inhibierung durch	Inaktivierung von
Proteinase A	I^A	I^B, I^C
Proteinase B	I^B	I^A, I^C
Proteinase C	I^C	-

Tab. 9: Gegenseitige Inaktivierung von Proteinasen und Inhibitoren

Die Proteinasen sind nach der Synthese im endoplasmatischen Reticulum in den Vakuolen lokalisiert (76). Die im Cytosol befindlichen Inhibitoren (77 - 80) sind wahrscheinlich am Transport der Proteinase vom endoplasmatischen Retikulum zu den Vakuolen beteiligt, wobei durch

die Bildung eines Proteinase-Inhibitor-Komplexes die Cytoplasma-Proteine vor einer unerwünschten Aktivität der Proteinase geschützt werden und damit eine Störung der Zellfunktionen verhindert wird (81).

Die Inaktivierung der Inhibitoren entsprechend Tabelle 8 erfolgt nicht nur am isolierten Inhibitor, sondern auch am entsprechenden Proteinase-Inhibitor-Komplex. Nachdem dieser Komplex vom Retikulum in die Vakuolen transportiert worden ist, können deshalb dort die Proteinase durch autokatalytische Spaltung freigesetzt werden. Die schematische Darstellung nach Saheki, Matsuda und Holzer (71) zeigt Abbildung 23.

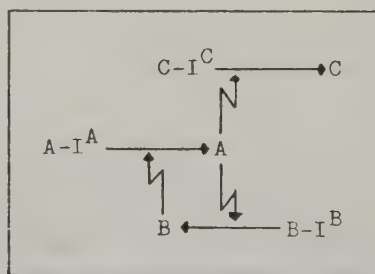


Abb. 23: Autokatalytische Aktivierung von Proteinase

Über den gesamten Regulationsmechanismus von Proteinase und Inhibitoren in der lebenden Zelle sind bisher noch keine Aussagen möglich. Es sind jedoch in vitro bereits viele Einzelschritte nachgewiesen worden, deren Ablauf in der Zelle möglich erscheint (81).

6.2. Aufgabenstellung:

Im folgenden werden die zur Aufklärung der Primärstruktur des Proteinaseinhibitors I_2^B durchgeführten Sequenzanalysen und ihre Ergebnisse beschrieben. Die Reindarstellung des Inhibitors, die Isolierung der Peptide des

gespaltenen Inhibitors sowie die Bestimmung der quantitativen Aminosäurezusammensetzung aus Hydrolysen wurden durch K. Maier (82), Biochemisches Institut der Universität Freiburg, durchgeführt.

6.3. Proteinaseinhibitor I₂^B

Aus Bäckerhefe lassen sich die Proteinase-B-Inhibitoren I₁^B und I₂^B im Verhältnis 1 : 3 isolieren. Beide Inhibitoren haben das gleiche Molekulargewicht von 9.000 dalton, die gleiche N-terminale Aminosäure Threonin und nach der quantitativen Aminosäureanalyse auch die gleiche Aminosäurezusammensetzung. Kohlehydrate und Nucleinsäuren sind nicht vorhanden. Cystin ist nach der quantitativen Analyse nicht vorhanden (82). Der Inhibitor besitzt also eine unvernetzte Peptidkette und kann deshalb direkt sequenziert werden.

Der Edman-Abbau wird zunächst mit Programm DMBA I (3.5.) am vollständigen Inhibitor vorgenommen und läßt sich über 50 Abbauschritte durchführen. In Position 41 wird dabei der nach der quantitativen Aminosäureanalyse einzige Tyrosinrest gefunden (s. Tab. 10). Da auch die drei nach der quantitativen Aminosäureanalyse vorkommenden Phenylalaninreste in den Positionen 4, 20 und 35 nachgewiesen werden, bietet sich eine Spaltung des gesamten Inhibitors mit Chymotrypsin an.

Chymotrypsin spaltet Proteine bei geeigneter Wahl der Reaktionsbedingungen relativ spezifisch. Sehr leicht wird an Methionin- und Argininresten gespalten, die jedoch nach der quantitativen Aminosäureanalyse nicht im Inhibitor vorkommen. Etwas schwerer werden Phenylalanyl- und Tyrosylbindungen gespalten. Bei wesentlich längeren Reaktionszeiten erfolgt danach die Spaltung weiterer Peptidbindungen.

Von den Spaltstücken wird mit Programm DMBA I das Peptid CH 5 sequenziert, das nach etwa 20 Abbauschritten verstärkt aus dem Reaktionsgefäß ausgewaschen wird.

Peptid CH 4 wird mit EDC und ANS nach 3.4.4. umgesetzt. Danach läßt es sich bis zum C-terminalen Ende mit Programm DMBA II abbauen.

Ein enzymatischer Abbau vom C-terminalen Ende her wird von Maier mit Carboxypeptidase A und Carboxypeptidase Y durchgeführt.

Die Primärstruktur des Inhibitors ist damit aufgeklärt. Der Inhibitor I_1^B weist in weiten Bereichen die gleiche Sequenz auf. Eine genaue Sequenzanalyse konnte jedoch noch nicht durchgeführt werden, da bisher nicht hinreichend gereinigtes und einheitliches Material in für eine Sequenzierung ausreichender Menge zur Verfügung stand.

6.4. Ergebnisse und Diskussion

Die einzelnen Analysen ergeben für den Inhibitor I_2^B die folgende Aminosäuresequenz:

```

  Thr - Lys - Asn - Phe - Ile - Val - Thr - Leu - Lys - Lys - 10
  1 ────────────────────────────────────────────────────────────

- Asn - Thr - Pro - Asp - Val - Glu - Ala - Lys - Lys - Phe - 20
  1 ────────────────────────────────────────────────────────────

- Leu - Asp - Ser - Val - His - His - Ala - Gly - Gly - Ser - 30
  1 ────────────────────────────────────────────────────────────

- Ile - Leu - His - Glu - Phe - Asp - Ile - Ile - Lys - Gly - 40
  1 ────────────────────────────────────────────────────────────

- Tyr - Thr - Ile - Lys - Val - Pro - Asp - Val - Leu - His - 50
  1 ────────────────────────────────────────────────────────────
    2 ────────────────────────────────────────────────────────────

- Leu - Asn - Lys - Leu - Lys - Glu - Lys - His - Asn - Asp - 60
  2 ────────────────────────────────────────────────────────────
    3 ────────────────────────────────────────────────────────────

- Val - Ile - Glu - Asn - Val - Glu - Glu - Asp - Lys - Glu - 70
  2 ────────────────────────────────────────────────────────────
  3 ────────────────────────────────────────────────────────────

- Val - His - Thr - Asn - OH
  3 ────────────────────────────────────────────────────────────
  4 ────────────────────────────────────────────────────────────
    4 ────────────────────────────────────────────────────────────
  
```

Die Ziffern 1 bis 4 beziehen sich auf die Sequenzanalysen

1 : Abbau des gesamten Inhibitors

2 : Abbau des Peptides CH 5

3 : Abbau des Peptides CH 4

4 : Abbau mit Carboxypeptidasen A und Y

Dabei sind die einzelnen Aminosäuren mit folgenden Ausbeuten gefunden worden:

Nr.	AS	%		Nr.	AS	%	%		Nr.	AS	%	%
1	Thr	82		26	His	TLC			51	Leu	56	
2	Lys	64		27	Ala	13			52	Asn	12	
3	Asn	52		28	Gly	10			53	Lys	14	45
4	Phe	86		29	Gly	10			54	Leu	47	20
5	Ile	55		30	Ser	9			55	Lys	10	68
6	Val	53		31	Ile	19			56	Glu	23	46
7	Thr	62		32	Leu	20			57	Lys	11	18
8	Leu	60		33	His	TLC			58	His	TLC	TLC
9	Lys	48		34	Glu	16			59	Asn	9	28
10	Lys	38		35	Phe	18			60	Asp	16	39
11	Asn	37		36	Asp	20			61	Val	8	27
12	Thr	44		37	Ile	12			62	Ile	4	26
13	Pro	67		38	Ile	16			63	Glu	4	24
14	Asp	53		39	Lys	8			64	Asn	2	14
15	Val	27		40	Gly	6			65	Val	5	21
16	Glu	61		41	Tyr	4			66	Glu	4	26
17	Ala	44		42	Thr	5	57		67	Glu	2	29
18	Lys	31		43	Ile	9	58		68	Asp	2	23
19	Lys	28		44	Lys	2	29		69	Lys		24
20	Phe	53		45	Val	5	24		70	Glu		19
21	Leu	35		46	Pro	3	33		71	Val		16
22	Asp	47		47	Asp	6	41		72	His		TLC
23	Ser	15		48	Val	5	23		73	Thr		8
24	Val	17		49	Leu	8	62		74	Asn		3
25	His	TLC		50	His	TLC	TLC					

Bei der Sequenzierung des gesamten Inhibitors und der Spaltpeptide wird eine gute Überlappung in einigen Be-

reichen gefunden. Der enzymatische Abbau vom C-terminalen Ende her ergibt für die letzten acht Aminosäuren die gleiche Sequenz wie der Edman-Abbau von Peptid CH 4. Außerdem stimmt die Anzahl der bei der Sequenzierung nachgewiesenen Aminosäuren mit der bei quantitativen Analysen von Inhibitor und Peptiden gefundenen Anzahl überein, wie aus Tabelle 10 hervorgeht. Die Richtigkeit der Sequenz kann deshalb als gesichert angenommen werden.

Aminosäure	Aminosäureanalyse	Sequenzanalyse
Alanin	2,08	2
Arginin	<0,1	-
Asparaginsäure	11,77	12
Cystein	<0,1	-
Glutaminsäure	7,32	7
Glycin	3,12	3
Histidin	5,99	6
Isoleucin	5,43	6
Leucin	5,65	6
Lysin	10,70	11
Methionin	<0,1	-
Phenylalanin	2,98	3
Prolin	2,08	2
Serin	2,14	2
Threonin	5,01	5
Tryptophan	<0,1	-
Tyrosin	0,94	1
Valin	7,95	8
Summe	73,16	74

Tab. 10: Quantitative Aminosäurezusammensetzung
des Proteinase-Inhibitors I₂^B

7. Zusammenfassung

1. Es sind Programme zur Sequenzierung von Proteinen und Peptiden unter Verwendung des Dimethylbenzylamin-Puffersystems entwickelt und erprobt, sowie die dabei aufgetretenen apparativen Schwierigkeiten überwunden worden.
2. Peptide lassen sich bis zur C-terminalen Aminosäure sequenzieren, wenn an alle freien Carboxylgruppen über eine Amidbindung β -Naphthylamindisulfonsäure gebunden wird.
3. Mit zwei Trennsäulen lassen sich alle aus natürlichen Proteinen und Peptiden erhaltenen Phenylthiohydantoin-Aminosäuren gaschromatographisch nebeneinander quantitativ bestimmen.
4. Die Phenylthiohydantoin-Derivate von Arginin, Cysteinsäure und Histidin lassen sich auch dünnschichtchromatographisch neben anderen Phenylthiohydantoin-Aminosäuren aus der wässrigen Phase parallel zur Gaschromatographie nachweisen.
5. Die Entwicklung der obengenannten Verfahren ermöglicht die Aufklärung der Primärstruktur des Proteinas-B-Inhibitors I_2^B aus Hefe:
 NH_2 -Tyr-Lys-Asn-Phe-Ile-Val-Thr-Leu-Lys-Lys-Asn-Thr-Pro-Asp-Val-Glu-Ala-Lys-Lys-Phe-Leu-Asp-Ser-Val-His-His-Ala-Gly-Gly-Ser-Ile-Leu-His-Glu-Phe-Asp-Ile-Ile-Lys-Gly-Tyr-Thr-Ile-Lys-Val-Pro-Asp-Val-Leu-His-Leu-Asn-Lys-Leu-Lys-Glu-Lys-His-Asn-Asp-Val-Ile-Glu-Asn-Val-Glu-Glu-Asp-Lys-Glu-Val-His-Thr-Asn-OH
6. An den Peptidketten $\alpha(A)$, β und γ von fetalem Fibrinogen werden ebenfalls sequenzanalytische Untersuchungen vorgenommen. Soweit der Edman-Abbau an den ge-

samen Ketten durchführbar ist, sind keine Unterschiede in der Aminosäuresequenz im Vergleich mit adultem Fibrinogen festzustellen.

7. Die γ -Kette von fetalem Fibrinogen wird mit Bromcyan gespalten. Von den neun erwarteten Spaltpeptiden lassen sich drei in einer für eine Sequenzanalyse ausreichenden Menge und Reinheit isolieren. Soweit der Edman-Abbau durchführbar ist, sind auch bei diesen Peptiden keine Unterschiede in der Aminosäuresequenz im Vergleich mit adultem Fibrinogen festzustellen.

8. Morphometrische Untersuchungen an Fibringerinnenseln aus fetalem und adultem Fibrinogen zeigen signifikante Unterschiede in Faserdicke, Faserlänge und der Dichte der Fibrinnetze. Das fetale Fibringerinnensel hat wesentlich dünnere und kürzere Fasern, die stärker vernetzt sind. Diese charakteristischen Eigenschaften ändern sich bei fetalem Fibrinogen, wenn das zur Gerinnung verwendete Material gefriergetrocknet wurde. Die Ergebnisse sind ein weiterer Beweis für die Existenz der molekularen Variante "fetales Fibrinogen".

8. Anhang

8.1. Abkürzungen

IR-	Infrarot-
PTH-	Phenylthiohydantoin-
DNF	Dinitrofluorbenzol
Dansyl-	1-dimethylaminonaphthalin-5-sulfonyl-
PITC	Phenylisothiocyanat
HFBA	Heptafluorbuttersäure
EDC	N-Äthyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbo- diimid
ANS	2-Aminonaphthalin-1,5-disulfonsäure
DMBA	N,N-dimethylbenzylamin
TMS-	Trimethylsilyl-
BSA	N,O-bis(trimethylsilyl)-acetamid
DMCS	Dimethyldichlorsilan
CM-	Carboxymethyl-
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
GLC	Gaschromatographie
TLC	Dünnschichtchromatographie
PBD	2-Phenyl-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazol
UV-	Ultraviolett-
DTT	Dithiothreitol
NIH-	National Institute of Health-
SP-	Sulfopropyl-
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
Asn	Asparagin
Cys	Cystein
Glu	Glutaminsäure
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
His	Histidin
Ile	Isoleucin

Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

8.2. Chemikalien

Für die Durchführung der experimentellen Arbeiten werden die Chemikalien folgender Firmen verwendet:

Wacker Chemie, München:

Siliconöl AK 350

Biotest Serum-Institut, Frankfurt am Main:

ACD-Stabilisator USP XVII B

Boehringer Mannheim AG, Mannheim:

Precimat

Merz und Dade, München:

LaB-Trol

Behringwerke AG, Marburg:

Rinder-Thrombin

Beckman Instruments Inc., Palo Alto, California:

Phenylisothiocyanat

Heptafluorbuttersäure

Quadrol-Puffer pH 9,0

DMBA-Puffer pH 9,4

n-Heptan

Äthylacetat

Benzol

Butylchlorid

Spermwal-Myoglobin

EGA-Chemie KG, Steinheim/Albuch:

N-Äthyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
2-Aminonaphthalin-1,5-disulfonsäure

Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt am Main:

G 10 Sephadex
G 25 Sephadex
G 50 Sephadex
SP-Sephadex C 50

Messer Griesheim GmbH, Darmstadt:

Stickstoff 99,995 %
Wasserstoff 99,995 %
Helium 99,995 %
synthetische Luft

Serva International, Heidelberg:

Silicone GE SE 30
Silicone DC 560
Silicone DC QF-1
Bromcyan, reinst
Amberlite MB-3, Mischbettionenaustauscher
CM-Cellulose-Ionenaustauscher, Servacel
Celluloseionenaustauscher P 23, Servacel

Schwarz-Mann, Orangeburg, New York:

Rinder-Insulin, A-Kette, oxydierte Form

Pierce Chemical Comp., Rockford, Illinois:

Silyl-8 GLC Column Conditioner
Stabiline GLC-Septa
Acetonitril, sequenal grade
Freon 113
N,O-bis-(trimethylsilyl)-acetamid
PTH-Aminosäuren

Macherey und Nagel, Düren:

Graphite Ferrules

Koch-Light Labs, Colnbrook, England:

2-Phenyl-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazol

Schleicher und Schüll, Dassel:

Micropolyamid-Platten F-1700

Calbiochem AG, Luzern:

Dithiothreitol, A grade

E. Merck AG, Darmstadt (alle verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel haben den Reinheitsgrad "zur Analyse")

Aceton

Acetanhydrid

Äthanol, 96 %

ϵ -Aminocaprinsäure

Ameisensäure

Ammoniaklösung, 25 %

Ammoniumsulfat

Androsteron

Ascorbinsäure

Chloroform

Chromosorb HP WAW-DMCS, 100 - 120 mesh

Dichlordimethylsilan

Dimethylformamid

DC Fertigplatten Kieselgel 60 F 254

Essigsäure, 100 %, indifferent gegen Chromsäure

Formvar

Harnstoff

Jodessigsäure

Kaliumchlorid

Kaliumdihydrogensulfat

Kaliumhydrogensulfat

Methanol, getrocknet

Natriumacetat

Natriumchlorid

Natriumhydroxyd

n-Pentan

Pyridin

Salzsäure, konz.

Toluol

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Uranylacetat

9. Literaturverzeichnis

=====

1. B. Blombäck, D. H. Hogg, B. Gårdlund, B. Hessel
B. Kudryk: Fibrinogen and fibrin formation.
Thromb. Res. 8, 329, 1976
2. G. Köppel: Electron microscopic investigation of the
shape of fibrinogen nodules: a model for certain
proteins. Nature 212, 1608, 1966
3. H. A. Scheraga, M. Laskowski: The fibrinogen-fibrin
conversion. J. Advan. Protein Chem. 12, 1, 1957
4. C. E. Hall, H. S. Slayter: The fibrinogen molecule:
its size, shape and mode of polymerisation. J. Bio-
phys. Biochem. Cytol. 5, 11, 1959
5. L. Bachmann, W. W. Schmitt-Pumian, R. Hammel, K.
Lederer: Size and shape of Fibrinogen, electron mi-
croscopy of the hydrated molecule. Makromol. Chem.
176, 2603, 1975
6. K. Laki, L. Lorand: On the solubility of fibrin
clots. Science 108, 280, 1948
7. M. Burstein, S. Lewi, P. Walter : Sur l'existence
du fibrinogène foetal. Sang. 25, 102, 1954
8. W. Künzer: Fetales Fibrinogen. Klin. Wschr.
39, 536, 1961
9. I. Witt, H. Müller, W. Künzer: Evidence for the
existence of foetal fibrinogen. Thromb. Diath.
Haemorrh. 22, 101, 1969
10. I. Witt, H. Müller: Phosphorus and hexose content
of human foetal fibrinogen. Biochim. Biophys. Acta
221, 402, 1970
11. I. Witt, K. Hasler: Influence of organically bound
phosphorus in fetal and adult fibrinogen on the ki-
netics of the interaction between thrombin and fi-
brinogen. Biochim. Biophys. Acta 271, 357, 1972
12. D. K. Galanakis, M. W. Mosesson: Evaluation of the
role of in vivo proteolysis (fibrinogenolysis) in
prolonging the thrombin time of human umbilical

- cord fibrinogen. Blood 48, 109, 1976
13. D. Karitzky, W. Künzer: Immunologische Fibrinogenbestimmung. in E. Deutsch: Immunologische Probleme der Blutgerinnung. F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart-NewYork, 1969
 14. A. J. Osbahr, J. A. Gladner, K. Laki: Studies on the physiological activity of the peptide released during the fibrinogen-fibrin conversion. Biochim. Biophys. Acta 86, 535, 1964
 15. R. J. Henry, C. Sobel, S. Berkman: Interferences with Diuret methods for serum proteins: use of Benedict's qualitative glucose reagent as a biuret reagent. Anal. Chem. 29, 1491, 1957
 16. K. Laki: The polymerisation of proteins: the action of Thrombin on fibrinogen. Arch. Biochem. Biophys. 32, 317, 1951
 17. D. Kay, B. J. Cuddigan: The fine structure of fibrin Brit. J. Haemat. 13, 341, 1967
 18. W. Krause, P. Zimmermann: Quantitative elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Fibrinstruktur bei Dysfibrinogenämie. Klin. Wschr. 50, 557, 1972
 19. E. R. Weibel: Morphological principles for morphometry in electron microscopic cytology. Int. Rev. Cytol. 26, 235, 1969
 20. B. L. van der Waerden: Mathematische Statistik. Die Grundlehren der mathematischen Wissenschaften in Einzeldarstellungen. Bd. 87. Springer Verlag
 21. G. W. Snedecor: Statistical methods. Iowa State College Press, 1948
 22. D. V. Lindley: Introduction to probability and statistics from a bayesian viewpoint. Cambridge University Press, 1965
 23. R. A. Fisher, F. Yates: Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Oliver & Boyd, Edinburgh, 1963
 24. M. Müller: Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung, experimentelle und theoretische Untersuchungen des Aggregationsmechanismus. Diplomarbeit im Institut für me-

25. F. Sanger: The free amino groups of insulin. *Biochem. J.* 39, 50), 1945
26. F. Sanger: The arrangement of amino acids in proteins. *Adv. Protein Chem.* 7, 1, 1952
27. W. R. Gray, B. S. Hartley: The structure of a chymotryptic peptide from *Pseudomonas cytochrome C-551*. *Biochem. J.* 89, 379, 1963
28. S. B. Needleman: Protein sequence determination. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1975
29. P. Edman, G. Begg: A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1, 80, 1967
30. R. A. Laursen: A solid-state Edman degradation. *J. Am. Chem. Soc.* 88, 5344, 1966
31. H. D. Niall, G. W. Tregear, J. Jacobs: Automated Edman degradation monitoring of solid-phase peptide synthesis in J. Meienhofer: Chemistry and biology of peptides, *Proc. Amer. Peptide Symp.*, 3rd, Boston, 1972. Ann Arbor Science Publ., Inc., Ann Arbor, Mich., 1972
32. J. C. Sheehan, G. P. Hess: A new method of forming peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1067, 1955
33. J. A. Foster, E. Bruenger, C. L. Hu, K. Albertson, C. Franzblau: A new, improved technique for automated sequencing of non-polar peptides. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 53, 70, 1973
34. R. L. Guyer, C. W. Todd: Protein sequencing: thermal conversion of thiazolinone derivatives of amino acids to thiohydantoins. *Anal. Biochem.* 66, 400, 1975
35. M. A. Hermodson, L. H. Ericsson, K. Titani, H. Neurath, K. A. Walsh: Application of sequenator analyses to the study of proteins. *Biochemistry* 11, 4493, 1972
36. P. Bornstein: The nature of a hydroxylamine-sensitive bond in collagen. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 36, 957, 1969
37. B. Wittman-Liebold: Amino acid sequence studies on

- ten ribosomal proteins of *Escherichia coli* with an improved sequenator equipped with an automatic conversion device. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1415, 1973
38. G. Pataki: Dünnschichtchromatographie. Verlag de Gruyter, Berlin, 1966
 39. M. C. Solal, J. L. Bernard: Miniature thin-layer chromatographie of phenylthiohydantoin amino acids: Application of automatic Edman degradation. J. Chromatogr. 80, 140, 1973
 40. K. D. Kulbe: Micropolyamide thin-layer chromatography of phenylthiohydantoin amino acids (PTH) at subnanomolar level. A rapid microtechnique for simultaneous multisample identification after automated Edman degradations. Anal. Biochem. 59, 564, 1974
 41. J. F. Klebe, H. Finkbeiner, D. M. White: Silylation with Bis(trimethylsilyl)acetamide, a highly reactive silyl donor. J. Am. Chem. Soc. 88, 3390, 1966
 42. A. S. Inglis, P. W. Nicholls: Acetylation of phenylthiohydantoins of amino acids. J. Chromatogr. 86, 117, 1973
 43. J. Pisano, C. Zimmerman, E. Appella, S. Morris: High performance liquid chromatography (HPLC) of amino acid phenylthiohydantoins. Fed. Proc. 33, 1502, 1974
 44. G. Frank, W. Strubert: Identifizierung von PTH-Aminosäuren mit Hilfe der schnellen Flüssigkeitschromatographie. Chromatographia 6, 522, 1973
 45. H. van Orden, F. Carpenter: Hydrolysis of PTH amino acids. Biochem. Biophys. Res. Com. 24, 113, 1966
 46. H. Hagenmaier, W. Ebbighausen, G. Nicholson, W. Vötsch: Massenspektrometrische Identifizierung der Phenylthiohydantoin-Derivate von Aminosäuren. Z. Naturforsch. 256, 681, 1970
 47. H. Bober: Eine Methode zur gas-chromatographischen Identifizierung von Phenylthiohydantoinderivaten der Aminosäuren. Beckman Report 1, 3, 1971

48. H. P. Angelé: Gaschromatographie. Akademie-Verlag Berlin, 1959
49. T. Inagami: Simultaneous identification of PTH-derivatives of histidine and arginine by thin-layer chromatography. *Analyt. Biochem.* 52, 318, 73
50. S. Yamada, H. A. Itano: Phenanthrenequinone as an analytical reagent for arginine and other monosubstituted guanidines. *Biochim. Biophys. Acta* 130, 538, 1966
51. C. W. Easley: Combinations of specific color reactions useful in the peptide mapping technique. *Biochim. Biophys. Acta* 107, 386, 1957
52. I. Witt, K. Hasler, D. Karitzky: Nachweis von fetalem Fibrinogen in Neugeborenen-Plasma. *Klin. Wschr.* 51, 703, 1973
53. D. Collen, G. N. Tytgat, H. Claeys, R. Piessens: Metabolism and Distribution of Fibrinogen; Fibrinogen turnover in physiological conditions in humans. *Brit. J. Haem.* 22, 681, 1972
54. E. Kleihauer: Fetales Hämoglobin und fetale Erythrocyten. F. Enke Verlag Stuttgart, 1966
55. A. Henschen, F. Lottspeich, T. Sekita, R. Warbinek: Amino acid sequence of human fibrin. Preliminary note on the order of peptides obtained by cleaving the γ -chain at the methionyl and arginyl bonds. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 357, 605, 1976
56. T. Takagi, R. F. Doolittle: Amino acid sequence of the carboxy-terminal cyanogen bromide peptide of the human fibrinogen γ -chain. *Biochim. Biophys. Acta* 386, 617, 1975
57. M. O. Dayhoff: Atlas of protein sequence and structure. Vol. 5, 1972, National Biomedical Research Foundation, Georgetown University, Medical Center
58. A. Henschen, P. Edman: Large scale preparation of S-carboxymethylated chains of human fibrin and fibrinogen and the occurrence of γ -chain variants. *Biochim. Biophys. Acta* 263, 351, 1972
59. J. McDonagh, H. Messel, R. P. McDonagh, G. Murano,

- B. Blombäck: Molecular weight analysis of fibrinogen and fibrin chains by an improved sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis method. *Biochim. Biophys. Acta* 257, 135, 1972
60. P. A. McKee, P. Mattock, R. L. Hill: Subunit structure of human fibrinogen, soluble fibrin and cross-linked insoluble fibrin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 66, 738, 1970
61. D. A. Mills, I. E. Liener, Partial chemical characterization of the isolated γ -chain of human fibrinogen. *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 629, 1969
62. W. W. Cleland: Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* 3, 480, 1964
63. C. B. Anfinsen, E. Haber: Studies on the reduction and reformation of protein disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 236, 1361, 1961
64. G. Murano, B. Wiman, M. Blombäck, B. Blombäck: Preparation and isolation of the S-carboxymethyl derivative chains of human fibrinogen. *FEBS Letters* 14, 37, 1971
65. W. B. Forman, M. Hadady: A simplified method for isolation of the S-carboxymethyl derivative chains of normal fibrinogen and fibrinogen Cleveland I. *Thrombosis Research* 8, 731, 1976
66. R. Gollwitzer, R. Timpl, U. Becker, H. Furthmayr: Chemical and immunological properties of reduced and alkylated polypeptide chains of bovine fibrinogen. *Eur. J. Biochem.* 28, 497, 1972
67. C. W. Hirs: Cleavage of peptide chains; in S. P. Colowick, N. O. Kaplan: *Methods in Enzymologie*, Vol. XI, 1967
68. E. Gross, B. Witkop: Selective cleavage of the methionyl peptide bonds in ribonuclease with cyanogen bromide. *J. Am. Chem. Soc.* 83, 1510, 1961
69. H. M. Kalckar: Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. *J. Biol. Chem.* 167, 461, 1947
70. A. Henschen, R. Warbinek: Amino acid sequence of

- human fibrin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1981, 1975
71. T. Saheki, Y. Matsuda, H. Holzer: Purification and characterization of macromolecular inhibitors of proteinase A from yeast. Europ. J. Biochem. 47, 325, 1974
 72. A. R. Ferguson, T. Katsunuma, H. Betz, H. Holzer: Purification and properties of an inhibitor of the tryptophan-synthase-inactivating enzymes in yeast. Europ. J. Biochem. 32, 444, 1973
 74. R. Hayashi, Y. Minami, T. Hata: Yeast pro-proteinase C. Part III. The activation b protein denaturants. Agr. Biol. Chem. 36, 621, 1972
 73. R. Hayashi, Y. Oka, T. Hata: Yeast pro-proteinase C. Part II. Isolation and some physicochemical properties. Agr. Biol. Chem. 33, 196, 1969
 75. J. F. Lenney, J. M. Dalbec: Yeast proteinase B: Identification of the inactive form as an enzyme-inhibitor complex. Arch. Biochem. Biophys. 129, 407, 1969
 76. P. Matile, A. Wiemken: The vacuole as the lysosome of the yeast cell. Arch. f. Mikrobiologie 56, 148, 1967
 77. H. Betz, H. Hinze, H. Holzer: Isolation and properties of two inhibitors of proteinase B from yeast. J. Biol. Chem. 249, 4515, 1974
 78. H. Matern, M. Hoffmann, H. Holzer: Isolation and characterisation of the carboxypeptidase Y-inhibitor from yeast. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4874, 1974
 79. H. Matern, H. Betz, H. Holzer: Compartmentation of inhibitors of proteinases A and B and carboxypeptidase Y in yeast. Biochem. Biophys. Res. Com. 60, 1051, 1974
 80. A. Hasilik, H. Müller, H. Holzer: Compartmentation of the tryptophan synthase proteolyzing system in *Saccharomyces cerevisiae*. Europ. J. Biochem. 48, 111, 1974
 81. Regulatory role of proteinases and proteinase in-

- hibitors in yeast. In T. Keleti, ed.: Proceedings of the 9th FEBS meeting "Mechanism of action and regulation of enzymes". Vol. 32, 181, 1975, Budapest, Akadémiai Kiadó.
82. K. Maier: Isolierung, Charakterisierung und Primärstruktur der Proteinase-B-Inhibitoren aus Hefe. Dissertation in der Fakultät für Biologie der Universität Freiburg, 1977
83. H. Rothweiler: Untersuchungen zur Charakterisierung von fetalem Fibrinogen. Dissertation in der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg, 1977
84. I. Witt, R. Tesch: Unveröffentlichte Ergebnisse.

Frau Prof. Dr. I. Witt und Herrn Prof. Dr. H. Holzer möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, die Arbeitsmöglichkeiten in ihren Laboratorien, die Unterstützung durch ihre Assistentinnen und ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft besonders herzlich danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Dipl. Chem. K. Maier für die gute Zusammenarbeit bei der Aufklärung der Primärstruktur des Proteinase-B-Inhibitors 2 bedanken.

Herrn Dr. H. Falk danke ich für die Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Die vorliegende Arbeit ist mit Mitteln des Sonderforschungsbereiches 46 "Molekulare Grundlagen der Entwicklung", Freiburg i. Br., der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, gefördert worden.

Lebenslauf

Am 26. 12. 1944 wurde ich als Sohn des Drogisten Hans Tesch und seiner Ehefrau Magdalene, geb. Siek, in Lahde/Weser geboren. Von 1951 bis 1955 besuchte ich die Grundschule in Wanne-Eickel. Bis zum Abitur im Jahre 1964 besuchte ich danach den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Gymnasiums Wanne-Eickel. Nach Ableistung meiner Wehrdienstzeit nahm ich im Wintersemester 65/66 das Studium der Chemie an der Technischen Universität Hannover auf. Im April 1968 legte ich die Diplom-Chemiker-Vorprüfung und im Oktober 1973 die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung in den Fächern Anorganische, Organische, Physikalische und Technische Chemie ab. Bis Mai 1974 fertigte ich danach die Diplomarbeit "Möglichkeiten der Durchführbarkeit von ramanspektroskopischen Untersuchungen im Laser-Resonator" bei Prof. Dr. H. von Weyssenhof im Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie, Abteilung für Photochemie an. Von Mai 1969 bis Juni 1973 arbeitete ich als wissenschaftliche Hilfskraft bei Prof. Dr. H. Glubrecht am Institut für Biophysik der Technischen Universität Hannover in der Forschungsgruppe Kurzzeitbiophysik. Seit Oktober 1964 arbeite ich bei Frau Prof. Dr. I. Witt am Projekt Sequenzer des SFB 46 "Molekulare Grundlagen der Entwicklung" in Freiburg i. Br.

